

**Aus der Abteilung für Molekulare Zellbiologie des Instituts für  
Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der  
Universitätskliniken Hamburg-Eppendorf  
Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel**

**Steht die Sialisierung von Apolipoprotein E im Plasma  
im Zusammenhang mit Hyperlipoproteinämien?**

**D i s s e r t a t i o n**

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von**

**Tim-André Orth  
aus Frankfurt am Main**

**Hamburg 2003**

**Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 12.08.2003**

**Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. h.c. U. Beisiegel**

**Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. F. U. Beil**

**Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Priv. Doz. Dr. W. Hampe**

**Meinen Eltern in Liebe gewidmet**

## Gliederung

	<u>Seite</u>
<b>1. <u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.1 Lipide im Plasma, Mikroemulsionen	1
1.2 Lipoproteine: Nomenklatur und Einteilung	2
1.3 Apolipoproteine	3
1.3.1 Apolipoprotein E (Bildung, Posttranslationale Modifikationen, Sialisierungen, Struktur und Funktion)	5
1.3.1.1 Struktur und Funktion von Apolipoprotein E	5
1.3.1.2 Apolipoprotein E-Polymorphismus	6
1.3.1.3 Posttranslationale Modifikation von Apolipoprotein E	9
1.4 Sialinsäuren, Sialisierungen weiterer Lipoproteine	16
1.4.1 Sialinsäuren und Arteriosklerose	16
1.4.2 Sialisierungen von Lipoproteinen	17
1.4.2.1 Sialisierungen von LDL	17
1.5 Triglyzeride und Arteriosklerose	19
1.5.1 Triglyzeridreiche Lipoproteine / TG-rich LP	20
1.5.2 Lipoproteinabnormitäten bei Hypertriglyzeridämie	22
1.5.3 Das Metabolische Syndrom	25
1.5.4 Postprandiale Hypertriglyzeridämie	27
<b>2. <u>Aufgabenstellung</u></b>	<b>29</b>
<b>3. <u>Materialien</u></b>	<b>30</b>
3.1 Patientenplasma	30
3.2 Neuraminidase	30
3.3 Reagentien und Standardseren	30
3.4 Antikörper	31
3.5 Chemikalien	31
3.6 Häufig verwendete Lösungen und Puffer	32
3.7 Weitere Materialien	34
3.8 Geräte	34
<b>4. <u>Methoden</u></b>	<b>35</b>
4.1 Patientenrekrutierung	35
4.2 Neuraminidasebehandlung	35
4.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	36
4.3.1 Auswertung der Blots	37
4.4 Dichtegradienten	38
4.4.1 Auswertung der Gradienten, Herstellung von Plasmapools	38
4.5 ApoE-Genotypisierung	40
4.6 Nachweisverfahren	41
4.6.1 Cholesterinbestimmung	41
4.6.2 Triglyzeridbestimmung	41
4.6.3 Proteinbestimmung (SDS-Lowry)	41
4.6.4 ApoE ELISA (Enzymimmunoassay)	42
4.6.5 Lp(a), Apo A-I- und Apo B <sub>100</sub> -Massenbestimmung	43
4.6.6 LpL-Aktivitätsbestimmung	43
4.6.7 Glukosebestimmung	43

<b>5. <u>Ergebnisse</u></b>	44
5.1 Grundlegende Vorbemerkungen/ Spezielle Ergebnisse	44
5.2 Beschreibung von Zusammenhängen und Korrelationen	61
5.2.1 Geschlechtszugehörigkeit	61
5.2.2 BMI	61
5.2.3 Apolipoprotein E-Genotypen	62
5.2.4 Cholesterin	62
5.2.4.1 HDL-, LDL- und VLDL-Cholesterin	63
5.2.5 Triglyzeride	64
5.2.6 Glukose	65
5.2.7 Apolipoprotein E-Masse	66
5.2.8 Lipoproteinlipase / Hepatische Lipase	69
<b>6. <u>Diskussion</u></b>	71
<b>7. <u>Zusammenfassung</u></b>	77
<b>8. <u>Anhang</u></b>	79
8.1 Literaturverzeichnis	79
8.2 Abbildungsverzeichnis	87
8.3 Tabellenverzeichnis und Datentabellen	89
8.4 Abkürzungsverzeichnis	94
<b>9. <u>Danksagung</u></b>	95
<b>10. <u>Lebenslauf</u></b>	96
<b>11. <u>Erklärung</u></b>	97

# 1 Einleitung

## 1.1 Lipide im Plasma, Mikroemulsionen

Die Blutlipide sind freie Fettsäuren, Mono-, Di- und Triacylglyceride, Phospholipide, Sterine (Cholesterin, Steroidhormone), Carotinoide und fettlösliche Vitamine, sowie Prostaglandine. Sie werden entweder mit der Nahrung aufgenommen (exogener Weg) oder vom Körper selbst synthetisiert (endogener Weg).

Da Lipide nicht wasserlöslich sind, werden sie entweder an spezifische Transportproteine gebunden oder sie lagern sich mit Apolipoproteinen zu mizellaren Komplexen, den Lipoproteinen, zusammen. Erst in dieser Form sind sie transportfähig. Ein Lipoprotein ist ein Partikel mit einem Kern aus hydrophoben Lipiden (= zentrale "Core-Lipide": apolare Cholesterinester, Triglyceride, Vitamine, u.a.); letzterer ist von einer Hülle aus polaren Lipiden (polare Phospholipide und freies Cholesterin) und Apolipoproteinen mit Kohlehydratresten umgeben. Da das Mengenverhältnis Hülle zu Kern thermodynamisch günstig sein muß, ergibt sich für fast alle Lipoproteine des Plasmas eine kugelförmige Struktur.

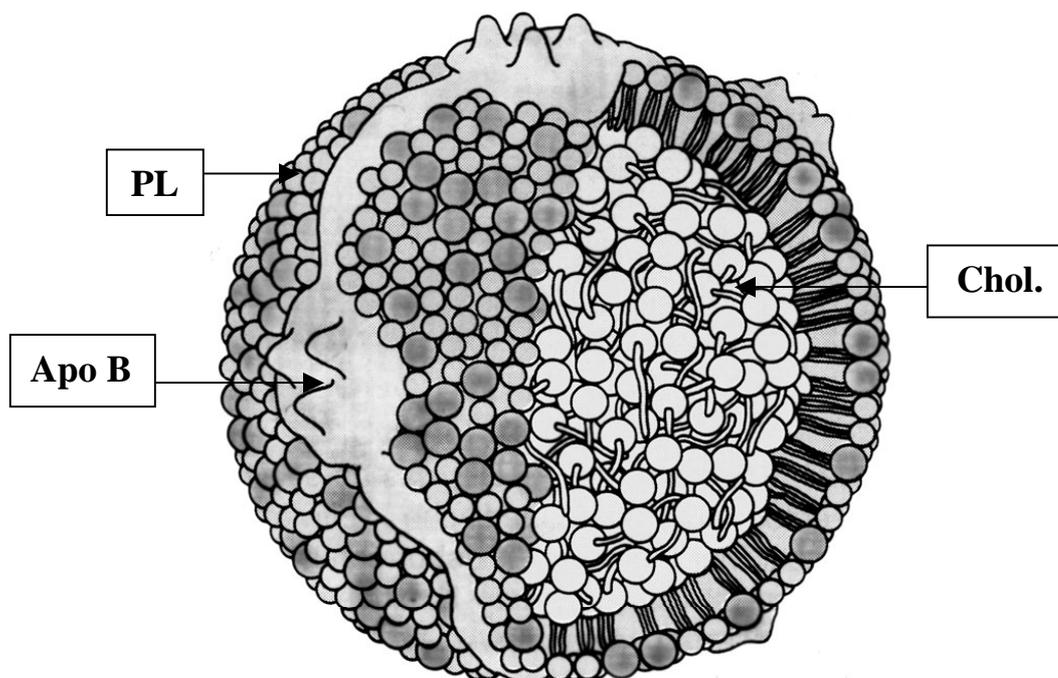


Abbildung 1 Schematische Darstellung eines Lipoproteins geringer Dichte (PL: Phospholipide, Apo B: Apolipoprotein B 100, Chol.: Cholesterin/ester)

## 1.2 Lipoproteine: Nomenklatur und Einteilung

Die Lipoproteinklassen werden nach ihrem Flotationsverhalten im Schwerefeld der Ultrazentrifugation nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit oder ihrer Apolipoproteinzusammensetzung benannt.

Die starre Klassifizierung nach der Dichte birgt die Gefahr von Fehlinterpretationen, da sich im Verlauf verschiedener Stoffwechselerkrankungen die Protein-Lipid-Zusammensetzung und somit auch die Dichte der Lipoproteine verändern kann. Unterschieden werden hier Chylomikronen, VLDL (very low-density lipoproteins), IDL (intermediate-density lipoproteins), LDL (low-density lipoproteins) und HDL (high-density lipoproteins).

Die Lipidelektrophorese stellt den heutigen Routinestandard der Lipoproteindifferenzierung dar und erlaubt die Einteilung in drei Hauptklassen entsprechend der Wanderung im elektrischen Feld:  $\alpha$ -Lipoproteine,  $\beta$ -Lipoproteine und Prä- $\beta$ -Lipoproteine.

Bei spezielleren wissenschaftlichen Fragestellungen werden die verschiedenen Lipoproteinpartikel aufgrund ihrer Apolipoproteinzusammensetzung definiert. Da die Lipoproteine im Zuge ihrer Verstoffwechslung einer ständigen Modifikation unterliegen, müssen alle Bezeichnungen als Momentaufnahmen betrachtet werden.

**Tabelle 1** Physikalische Lipoproteinparameter [90]

	<b>Dichte (kg/l)</b>	<b>Größe (nm)</b>	<b>Elektrophoresefraktion</b>	<b>Apolipoprotein</b>
<b>Chylomikronen</b>	<1,000	<10 000	keine Wanderung	A, B-48, C, E
<b>VLDL</b>	<1,006	50	Prä- $\beta$	B-100, C, E
<b>IDL</b>	<1,019	30	(floating pre- $\beta$ )	B-100, C, E
<b>LDL</b>	<1,063	21	$\beta$	B-100
<b>HDL</b>	<1,210	10	$\alpha$	A, AI, AII

**Table 2** Chemische Zusammensetzung der Plasmalipoproteine  
(in % der Lipoproteinmasse) [93]

Lipoprotein	Protein	Lipide	Freies Cholesterin	Cholesterin-ester	Triglyceride
Chylomikronen	2	5	1	2	90
VLDL	10	16	7	13	54
IDL	17	20	9	34	20
LDL	23	21	11	41	4
Lp(a)	34	18	9	36	3
HDL	48	30	6	16	3

Neben den genannten Lipoproteinen gibt es auch sogenannte "Pathologische Lipoproteine", die sich unter anderem bei Dyslipoproteinämien (z.B.:  $\beta$ -VLDL bei Typ III-HLP), Cholestase und diversen weiteren Erkrankungen im menschlichen Plasma finden, so z.B. Lp(a), ein dem LDL verwandtes cholesterinreiches Lipoprotein, das neben dem Apolipoprotein B-100 das Apolipoprotein (a) enthält [90]. Es ist ein Glykoprotein mit hoher Strukturhomologie zum Plasminogen und besitzt auch dessen zahlreiche „kringle-Domänen“ und eine Proteaseregion. Lp(a) wird in der Leber gebildet und gilt bei Werten >25mg/dl als Arteriosklerosiserisikofaktor [94]

### 1.3 Apolipoproteine

Die Apolipoproteine sind nach der Definition von *Alaupovic* [1] Proteine oder Polypeptide, die mit Lipiden beladen den Ort ihrer Synthese verlassen, wobei ihre Hauptaufgabe die Stabilisierung von Lipidemulsionen und der Transport von Lipiden ist.

Ohne Apolipoproteine können Lipide weder aus der Zelle freigesetzt, noch können sie in ausreichender Menge wieder von Zellen bzw. Organen über spezifische Rezeptoren, als deren Liganden sie dienen, aufgenommen werden.

Apolipoproteine modulieren die Aktivität diverser Enzyme des Fettstoffwechsels.

**Tabelle 3** Überblick der verschiedenen Apolipoproteine [95]

<b>Apolipoprotein</b>	<b>Dichteklassen</b>	<b>Masse (kDa)</b>	<b>Konz.(mg/l)</b>	<b>Funktionen</b>
AI	HDL	28,5	1200-1400	Strukturprotein der HDL, Aktivierung der LCAT, Bindung an HDL-Rezeptoren, Prostacyclin-Stabilisierung
AII	HDL	17	350-500	Aktivierung der hepatischen Lipase ?
AIV	CM, HDL	46	<50	Triglyceridstoffwechsel, Aktivierung der LCAT
B100	LDL, VLDL	550	700-900	1) Strukturprotein der VLDL und LDL 2) Sekretion von TG und Cholesterin aus Leber und Dünndarm, 3) Bindung an B/E - Rezeptor (=LDL-Rezeptor), Aktivierung der Lyssolezithin-Azyltransferase
B48	CM, $\beta$ -VLDL	265	<50	1) Strukturprotein der Chylomikronen 2) Resorption von Lipiden und lipidlös. Vitaminen aus der Nahrung
CI	CM, VLDL	6,5	50-80	Unterdrückung der Bindung von LP an den B/E-Rez. und an LRP, Aktivierung der LCAT
CII	CM, VLDL	8,8	30-70	Aktivierung der Lipoproteinlipase (LPL)
CIII	CM, VLDL	8,9	100-120	Inhibierung der LPL, Interferenz mit Rez.
D	HDL III	29	80-100	Aktivierung und Stabilisierung LCAT
E	CM, VLDL, HDL	34	30-50	Ligand für B/E- sowie E-Rezeptor, Ausschleusung von Cholesterin aus peripheren Zellen „reverse cholesterol transport“

### 1.3.1 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E hat vielseitige Funktionen. Gebildet wird es hauptsächlich in der Leber, aber auch in Gehirn (Astrozyten), Milz, Lunge, Nieren, Muskeln und von Makrophagen, wobei etwa drei Viertel als Bestandteil der VLDL der Leber entstammen. Die durchschnittliche Apo E-Konzentration im Plasma schwankt zwischen 30 und 50 mg/l [96].

#### 1.3.1.1 Struktur und Funktion von Apolipoprotein E

Apo E besteht aus 299 Aminosäuren und hat die Masse von etwa 34000 Da. Das Gen, welches für Apo E kodiert, wurde auf Chromosom 19 gefunden und hat eine Länge von 3,7 kb. Seine DNA kodiert für eine 1163 Basenpaar-lange mRNA, deren Translationsprodukt noch einigen posttranslationalen Modifikationen unterliegt. Die Sekundärstruktur von Apolipoprotein E kann in drei Hauptanteile gegliedert werden:

1. Eine hochgeordnete aminotermine Domäne (bis Position 191),
2. eine 35 Positionen lange ungeordnete "Hinge"-Region
3. und eine wiederum hochgeordnete carboxyterminale Domäne.

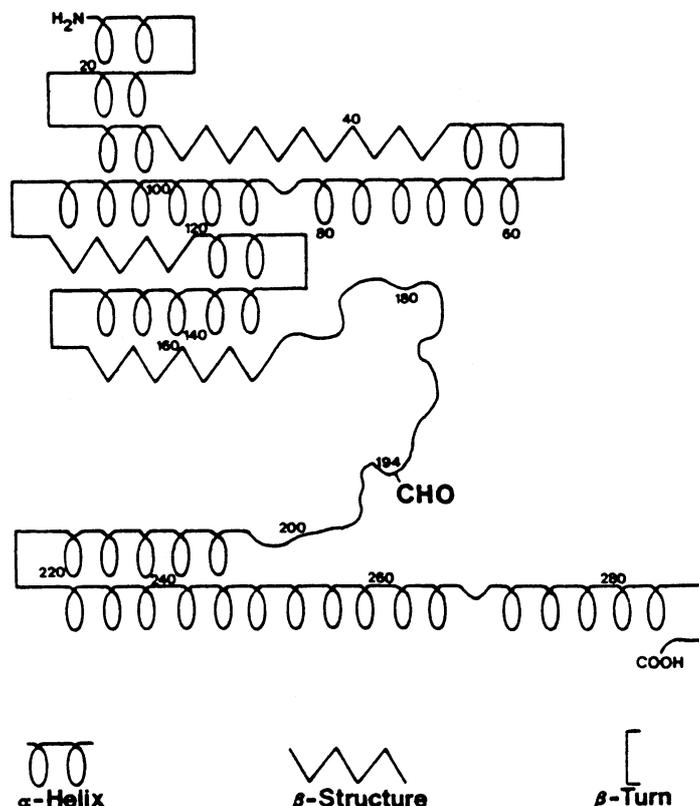


Abbildung 2 Apolipoprotein E Sekundärstruktur

Die aminoternale Domäne, etwa zwei Drittel des Moleküls, beinhaltet den für die LDL-Rezeptor-Bindung essentiellen Bereich, welcher aus fünf Arginin- und drei Lysinresten zwischen Position 136 und 150 besteht (*Weisgraber et al.* [2]).

Apo E agiert als Ligand für den LDL-R (B/E-Rezeptor), an den es mit höherer Affinität als Apo B bindet. Als solcher spielt es eine wesentliche Rolle im "**reverse cholesterol transport**" durch HDL in die Leber [88]. Ein zweiter Apo E-bindender Rezeptor, als Chylomikronen-Remnant-Rezeptor oder LDL-R-related protein(LRP) bezeichnet, wurde 1989 beschrieben (*Beisiegel et al.* [62])

Die carboxyterminale Domäne beinhaltet eine amphipathische Helix mit polaren und apolaren Resten, die als Hauptlipidbindungsregion fungiert [2]; der Bereich innerhalb der Rezeptor-bindenden Domäne zwischen den Positionen 142 und 147 ist heparinbindend [2].

### **1.3.1.2 Apolipoprotein E-Polymorphismus**

Es existieren verschiedene **Isoformen des Apolipoproteins E**, die durch genetischen Polymorphismus bedingt sind. Die drei häufigsten genetisch determinierten Isoformen werden E-4, E-3 und E-2 genannt [3]. Die korrespondierenden Allele für diese drei Genprodukte heißen  $\epsilon_4$ ,  $\epsilon_3$  und  $\epsilon_2$ . Daraus ergeben sich sechs Phänotypen, drei homozygote (E-4/4, E-3/3, E-2/2) und drei heterozygote (E-4/3, E-3/2, E-4/2) [3]. Es finden sich noch viele weitere genetische Varianten des Apo E, die jedoch selten sind und in diesem Zusammenhang nicht weiter erwähnt werden.

Das eher seltene **Apo E-1** zeigt einen Austausch von Glycin an Position 127 in Asparagin, wie auch von Arginin an Position 158 in Cystein und wird mit Typ-III-HLP/Atherosklerose assoziiert [92] . **Apo E-2** unterscheidet sich von **Apo E-3** durch einen Austausch von Cystein gegen Arginin an Position 158. Dadurch erlangt Apo E-2 eine zusätzliche negative Ladung (Relative Ladung: 0), welche für die signifikant schlechtere Rezeptorbindungsaktivität von weniger als 2 % der als Wildtyp angesehenen

E-3-Form verantwortlich zu sein scheint (*Mahley et al.* [88]). Der Grund für dieses defektive Bindungsverhalten scheint in der Formation einer neuen Salzbrücke zwischen Asp-154 und Arg-150 zu liegen [63]. Dies hat zur Folge,

daß das für die Rezeptorbindung wichtige Arg-150 aus der Rezeptorbindungsregion transloziert wird. *Weisgraber et al.* [64] bestätigten diese Theorie, indem sie Asp-154 mit Alanin austauschten, wodurch die Rezeptorbindungs-Aktivität fast auf normale Werte anstieg. Apo E-2 ist assoziiert mit der Typ-III Hyperlipoproteinämie.

Bei **Apo E-4** wurde Cystein durch Arginin an Position 112 ersetzt, was zu einer relativen Ladung von +2 führt. Da Position 112 außerhalb der für die LDL-R wichtigen Zone liegt, besitzt Apo E-4 immer noch 100 % der normalen Rezeptorbindungsaktivität [88].

Die unterschiedlichen Isoformen zeigen verschiedene Präferenzen bezüglich der Lipoproteinklasse. Apo E-4 ist meistens mit triglyzeridreicher VLDL assoziiert, während Apo E-2 und Apo E-3 die kleinen, phospholipidreichen HDL bevorzugen [2]. Da die Unterschiede nicht die lipidbindende carboxyterminale Domäne betreffen, vermuten *Weisgraber et al.* [2] eine Interaktion zwischen der amino- und der carboxyterminalen Domäne.

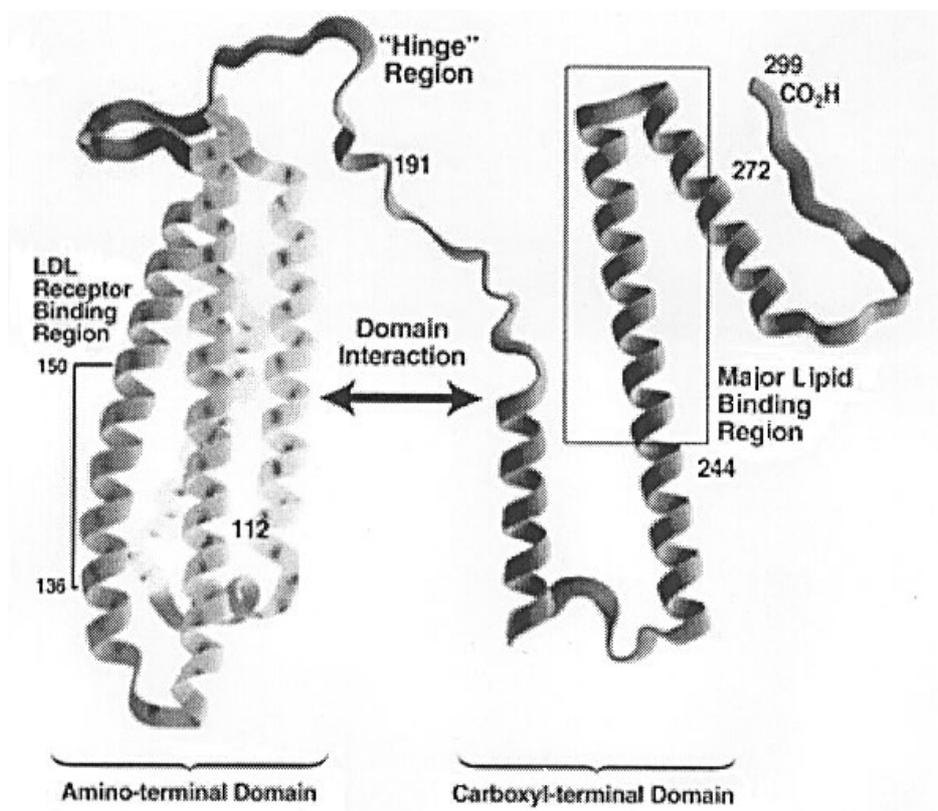


Abbildung 3 Dreidimensionale Darstellung der Apolipoprotein E Sekundärstruktur

Diese Ladungsdifferenzen erlauben eine Identifikation der Isoformen und somit des Phänotyps durch **Isoelektrische Fokussierung (IEF)**.

Tabelle 4 Ladungsdifferenzen der unterschiedlichen Apo E-Isoformen

	<i>E-2/2</i>	<i>E-3/3</i>	<i>E-4/4</i>
<b>Relative Ladung</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+2</b>
<b>IEP</b>	<b>5.8</b>	<b>6.0</b>	<b>6.3</b>
<b>Position 112</b>	<b>Cys</b>	<b>Cys</b>	<b>Arg</b>
<b>Position 158</b>	<b>Cys</b>	<b>Arg</b>	<b>Arg</b>

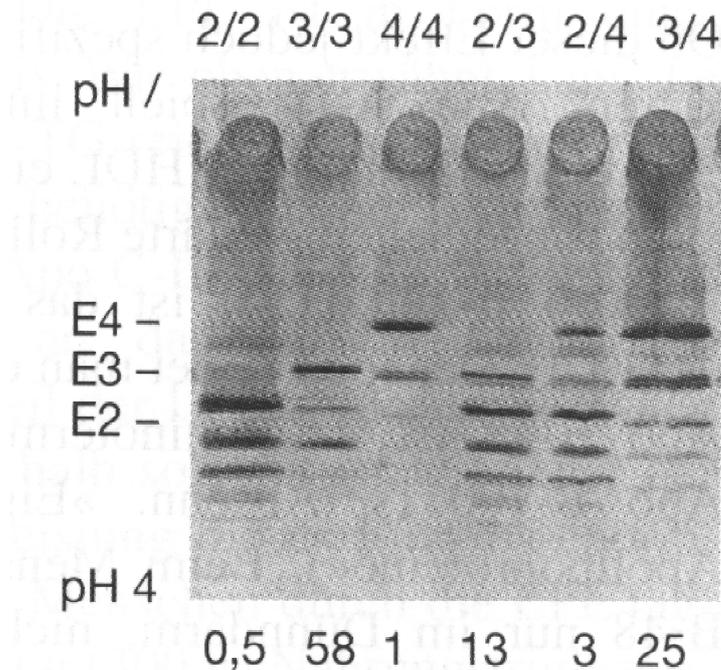


Abbildung 4 Apolipoprotein E Phänotypisierung in der Isoelektrischen Fokussierung [97] Genetischer Polymorphismus des Apolipoprotein E. Die Abbildung zeigt die 6 häufigen Apo E- Phänotypen, wie sie mit Isoelektrischer Fokussierung im immobilisierten pH- Gradienten und Immunoblotting nachgewiesen werden können.

Genotypisch läßt sich der Apo E-Polymorphismus auch mittels **Restriktionsanalyse amplifizierter DNS nachweisen** [61]. Diese Genotypisierung erweist sich als sehr spezifisch; allein eingesetzt ist ihr Nachteil aber, daß Mutationen, die nicht die Positionen 112 und 158 betreffen, nicht erkannt werden.

### 1.3.1.3 Posttranslationale Modifikation von Apolipoprotein E

In der IEF findet man neben den genetisch determinierten Isoformen zusätzliche Banden. Diese entstehen durch **posttranslationale Modifikationen** der jeweiligen Isoform mit unterschiedlichen Mengen an Neuraminsäureresten [6].

**Neuraminsäuren (= Sialinsäuren)** sind Aminosucker aus Mannosamin und Brenztraubensäure. Sie sind natürliche Bausteine in Gangliosiden, Glykolipoiden und -proteiden, die vor allem in Drüsensekreten, Zellmembranen und dem Blutplasma vorkommen [91].

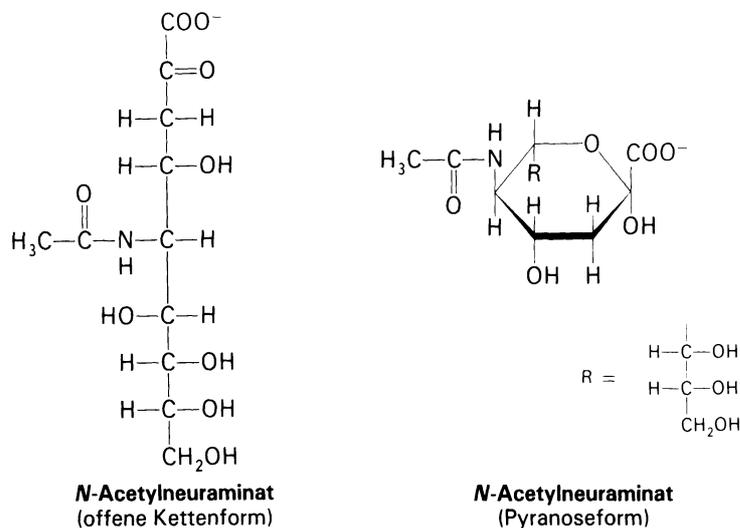


Abbildung 5 Darstellung von N-Acetylneuraminsäuren (offene und Pyranoseform)

Viele neu synthetisierte Glykoproteine, etwa Immunglobuline und Peptidhormone, enthalten Kohlenhydrateinheiten mit endständigen Sialinsäureresten [91].

Je nach Proteintyp werden im Verlauf von Stunden oder von Tagen die Sialinsäurereste durch Neuraminidasen, die sich auf der Oberfläche von Blutgefäßen befinden, entfernt [91]. Die freigelegten Galactoseeinheiten dieser so veränderten Proteine werden von den Asialoglykoproteinrezeptoren in der Plasmamembran von Leberzellen erkannt und das entsprechende Protein aus der Zirkulation entfernt [91]. Sialinsäuren beeinflussen bei bestimmten Proteinen also die Zirkulationszeiten [91]. Wie sich dies beim Apolipoprotein E verhält, wird an anderer Stelle besprochen.

Jeder Neuraminsäurerest führt eine zusätzliche negative Ladung in das Apolipoprotein-E-Molekül ein, die zu Verschiebungen des IEP und damit der Bandenlokalisierung innerhalb einer IEF führen kann [3]. Den jeweiligen sialisierten Isoformen wird nach der von *Zannis et al.* [3] 1982 vorgeschlagenen Nomenklatur ein s und die Anzahl der Reste angefügt (z.B.: Apo E-3s2 für Apo E-3 mit 2 Sialinsäureresten).

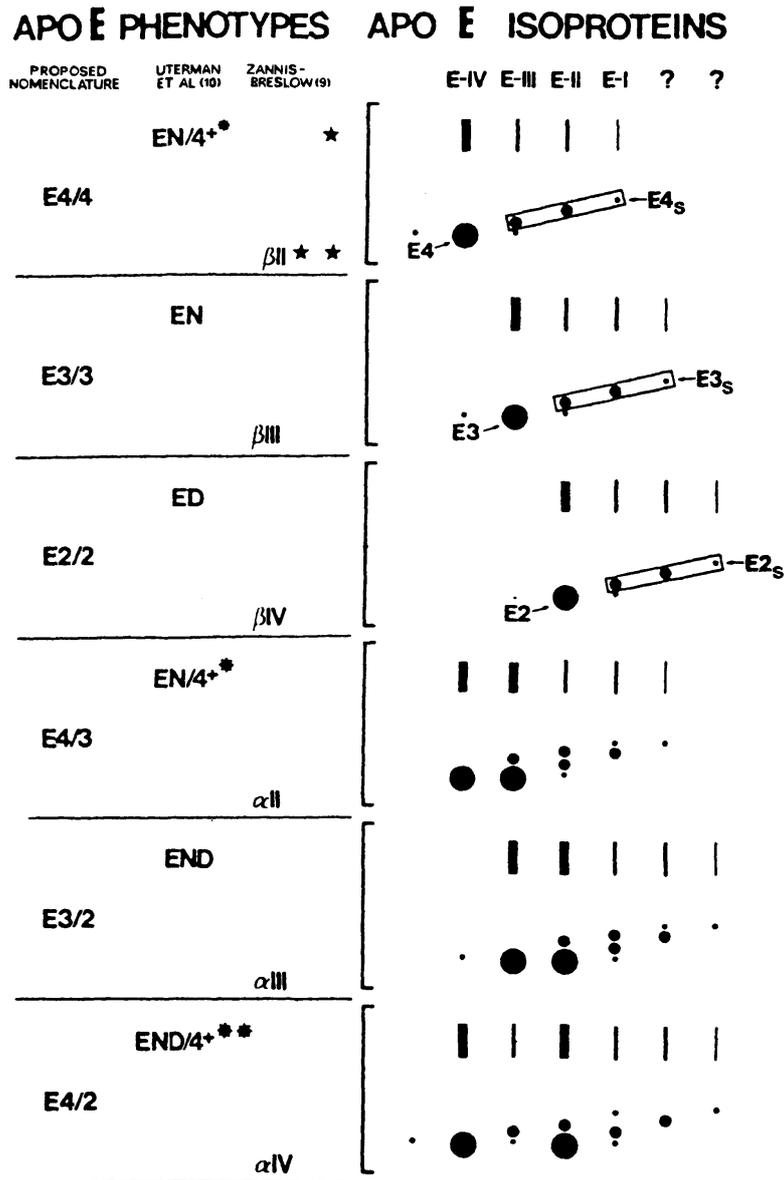
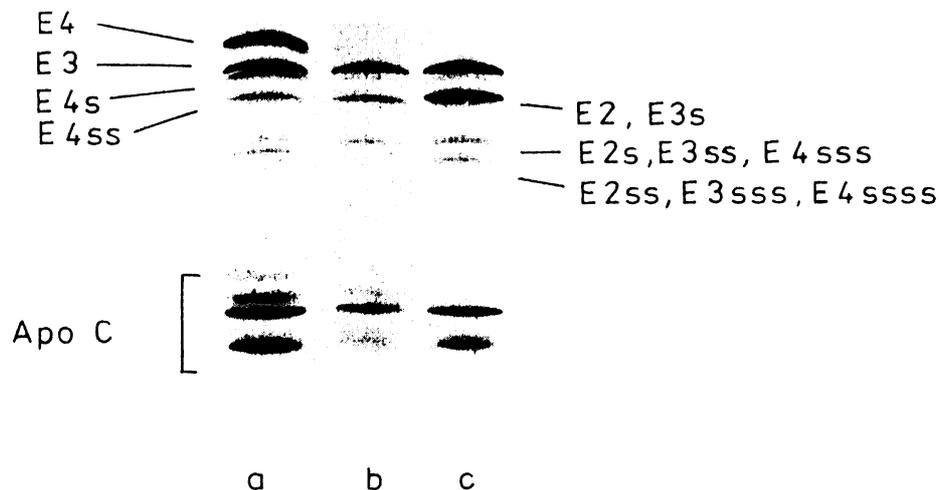


Abbildung 6 Schematische zweidimensionale Darstellung einer Apo E Phänotypisierung in der IEF mit Nomenklatur von Apolipoprotein E Phänotypen nach Zannis et al.[3].

Die sialisierten Isoformen werden in der IEF näher an der Anode lokalisiert, was zu einer vermeintlichen Zunahme des Anteils an stärker negativ geladenen Apolipoprotein E-Formen führen kann. Zum Beispiel würde man ein sialisiertes Apo E-3 in der IEF an der Position von Apo E-2 wiederfinden [3].



**Abbildung 7** Apolipoprotein E Phänotypisierung in der Isoelektrischen Fokussierung  
Nomenklatur der sialisierten Extrabanden

Um den möglichen Fehlklassifikationen vorzubeugen ist es ratsam, vor der Durchführung einer IEF die Sialinsäurereste durch Vorbehandlung mit Neuraminidase/Sialidase abzuspalten [4].

Durch Restriktionsanalyse amplifizierter DNS ist es möglich zu kontrollieren, ob der Phänotyp dem Genotyp entspricht. Da sich auch nach einer Vorbehandlung mit Neuraminidase weiterhin teilweise Diskrepanzen zwischen dem Phäno- und Genotypen zeigten, wurden verschiedene Ursachen für dieses Problem diskutiert.

*Wenham et al.* [4] diskutierten in diesem Zusammenhang den Effekt nichtenzymatischer Glykosylierungen (durch Bindung von Glukose an reaktive Aminogruppen, meist Lysinseitenketten von Proteinmolekülen, entstehen Ketoamin-Verbindungen). Diese Glykosylierungen werden gehäuft bei Diabetikern beobachtet [4].

Dabei fand sich allerdings kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der gefundenen Diskrepanzen zwischen Phäno- und Genotyp zwischen einem Kollektiv von Diabetikern und einer Kontrollgruppe von Nichtdiabetikern.

Neuere Studien (*Kopitzsch et al.* [5]) beschreiben hingegen einen signifikant höheren Sialisierungsgrad von Apo E bei IDDM und NIDDM, was zu einer höheren Inzidenz von Diskrepanzen führen müßte. Durch diese Ergebnisse gewinnt auch das Thema der "nichtenzymatischen Glykosylierungen von Apolipoprotein E" wieder an Aktualität.

Weitere mögliche Gründe für das Vorkommen von Diskrepanzen zwischen dem Geno- und dem Phänotypen von Apo E:

- Eine möglicherweise ineffektive Verdauung durch die Neuraminidase würde zu Missklassifikationen aus oben genannten Gründen führen.
- Der monoklonale Antikörper, welcher im Verlauf der Färbung der Blots verwendet wird, könnte die unterschiedlich geladenen Isoformen verschieden gut „erkennen“ und somit zu Interpretationsfehlern führen.
- Die unterschiedlichen Plasmakonzentrationen der jeweiligen Isoformen von Apolipoprotein E (homozygote E-4-Individuen haben die niedrigsten, jene mit E-2 die höchsten Apo E-Plasmaspiegel) führen bei gleicher prozentualer Anteile (24%) [6] an sialisiertem Apolipoprotein E zu einem unterschiedlichen Anteil an sialisierten Extrabanden als massenabhängig Phänomen. Ebenso können Apo E Isoformen von niedriger Konzentration in der IEF unerkant bleiben.
- Unbekannte, in der Routinegenotypisierung nicht erkannte Mutationen können zu Veränderungen in der Phänotypisierung und somit zu Diskrepanzen führen.

Zur Herkunft der N-Acetylneuramin -säurereste/Sialinsäurereste :

Wie *Zannis et al.* 1984 nach Versuchen mit *der Human hepatoma cell line HepG2* berichteten [6], wird zunächst ein 317AS **prä-Apo E** mit einem 18-Aminosäuren-langen **Signalpeptid**

- (Sequenz: MetLysValLeuTrpAlaAlaLeuLeuValThrPheLeuAlaGlyCysGlnAla, relative Ladung +1)

am NH<sub>2</sub>-terminalen Ende synthetisiert. Nach noch intrazellulärer Abspaltung dieses Signalpeptids erfolgt teilweise eine o-Glykosylierung im Golgi-Apparat mit Kohlenhydratketten, welche N-Acetylneuraminsäuren (=Sialinsäuren, Aminosucker aus Mannosamin und Brenztraubensäure) enthalten. 42 % des intrazellulären Apo E, 81% vom neu sezernierten Apo E und 24% vom Plasma-Apo E sollen nach dieser Quelle in sialisierter Form vorliegen [6]. Dies führte zu der These, daß neu sezerniertes Apo E im Plasma desialisiert werden müsse. Da nur 42 % des intrazellulären Apo E sialisiert vorliegen, demgegenüber aber 81% des neu sezernierten, wurde diskutiert, ob eine Sialisierung für die Sezernierung obligat sei, oder ob zumindest bevorzugt sialisiertes Apo E sezerniert werden würde. Der These der Desialisierung von neu sezerniertem Apo E widersprachen 1986 *Ghiselli et al.* [9] bei Versuchen mit radioaktiv markiertem asialo-Apo E und disialo-Apo Es<sub>2</sub>. Dabei konnte keine Konversion der Disialo- in die Asialoform beobachtet werden. Auch der Überlegung, Sialinsäurereste könnten bei Apo E, wie auch bei anderen Glykoproteinen, den Katabolismus verlangsamen und somit die Umlaufzeit verlängern, wurde als Ergebnis dieser Versuche widersprochen. Es fand sich sogar im Gegenteil ein leicht schnellerer Umsatz bei Apo Es<sub>2</sub> als bei asialo-Apo E. Im Plasma ließ sich nur eine geringe Aktivität der Neuraminidase/Sialidase nachweisen, dafür aber deutlich in Membranen von Säugetierlebern [10] und Blutzellen [11].

*Zannis et al.* [8] weisen ergänzend darauf hin, daß Apo E vermutlich in Form von 3 Isoproteinen freigesetzt wird, welche durch die o-glykosidische Bindung von Sialinsäure enthaltenden Oligosaccharidketten an das Protein entstehen.

Diese 3 Hauptformen sollen 2 (ApoEs2), 4 (ApoEs4) oder 6 (ApoEs6) Sialinsäurereste enthalten. Auch diese Versuche wurden mit HepG2-Zellkulturen durchgeführt. *Ghiselli et al.* [9] vermuteten die Existenz einer Sialidase, die spezifisch höher sialisierte (>2) Isoformen rasch desialisiere, da diese Formen nicht im normalen Plasma vorkommen. Als weitere Hypothese nannten sie die Möglichkeit, daß höher sialisiertes Apo E direkt und schnell katabolisiert werde. Diese Beobachtung paßt zur erhöhten Aufnahmerate von HDL in HepG2-Zellen, wenn es einen gesteigerten Gehalt an sialisiertem Apolipoprotein E aufweist [65].

1985 identifizierten *Weisgraber et al.* [7] eine von zwei möglichen Stellen als einzige Sialisierungsstelle bei disialo-Apo Es2. Es handelte sich hierbei um **Thr-194**. Diese Position der Anheftung von Sialinsäureresten wurde in Versuchen von *Wernette-Hammond et al.* [12] 1988 bestätigt. Weiterhin sah man, daß disialo-Apo E einen GalNAc-Rest und einen GlcNAc-Rest enthielt, was die Existenz einer verzweigten Kohlenhydratstruktur nahelegte. Demgegenüber schien die Kohlenhydratstruktur der Monosialoformen einfacher aufgebaut zu sein. Ihnen fehlten im Vergleich zum disialo-Apo E nicht nur ein Sialinsäurerest, sondern auch jegliche weitere neutrale Zuckerreste. Weil o-glykosylierte Zucker selten mehr als 2 Sialinsäurereste enthalten, wird vermutet, daß zusätzliche Bindungsstellen existieren [12].

Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist die Tatsache, daß eine Sialisierung nicht essentiell für die Freisetzung von Apo E ist.

Die Funktion der Apo E-Sialisierung und die Art der Umwandlung der verschieden sialisierten Formen ist noch ungelöst. Diesbezüglich existieren noch folgende Hypothesen:

- Da die Hinge-Region, in welcher ja die Sialinsäurereste in der mono- und disialo-Variante lokalisiert sind, die empfindlichste Stelle des Proteins gegenüber proteolytischen Enzymen ist [13], könnte die einfache Sialisierung dem **Schutz von Apo E vor der Proteolyse** dienen.

- Unterschiedliche Apo E-Sialisierungen könnten das jeweilige **Apo E zu spezifischen Lipoproteinklassen dirigieren**. Daß sialisiertes Apolipoprotein E **mit höherer Affinität an HDL bindet**, konnte schon nachgewiesen werden [65].
- Höher sialisierte (>2) Isoformen mit zusätzlichen Resten außerhalb der Hinge-Region könnten die **Rezeptorbindung verändern**. HDL mit einem hohen Anteil an sialisiertem Apo E wird von HepG2-Zellen schneller aufgenommen als HDL ohne sialisiertes Apolipoprotein E [65].
- Neu sezerniertes Apo E aus fetaler Leber und aus der HepG2-Linie, welches in vielen Studien verwendet wurde, ist größtenteils sialisiert. Es könnte sein, daß es sich bei Syntheseprodukten der Erwachsenenleber anders verhält.

Da, wie *Ito et al.* [14] 1992 zeigten, eine signifikante Korrelation zwischen Serumtriglyceriden und dem Anteil des sialisierten Apo E besteht, könnte eine Auslastung der Enzymkapazität der LPL zu einem Ansteigen der sialisierten Formen führen. Auch die Tatsache, daß der Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E beim insulinunabhängigen Diabetes mellitus im Vergleich zu Kontrollgruppen signifikant erhöht ist (*Kopitzsch et al.* [5]), könnte für eine Beteiligung der LPL sprechen, da Insulin die Lipoproteinlipase aktiviert, zum anderen haben Diabetiker oft erhöhte Plasmatriglyceridspiegel. Auch eine Erhöhung des Serumsialinsäurespiegels bei Patienten mit einer Insulindefizienz konnte beobachtet werden. Eine besonders ausgeprägte Hyperglykämie scheint eine eher untergeordnete Rolle zu spielen [66, 67].

All diese Daten zeigen die enge Verknüpfung des Sialisierungsgrades von Apolipoprotein E mit einer Reihe verschiedener Stoffwechselfvorgänge, insbesondere aber mit dem Lipidstoffwechsel. Hierbei ist ein spezielles Augenmerk auf die Triglyceride zu richten, deren Metabolismus und Effekte auf den menschlichen Körper Thema eines weiteren Abschnittes sind.

## **1.4 Sialinsäuren, Sialisierungen weiterer Lipoproteine**

### **1.4.1 Sialinsäuren und Arteriosklerose**

Sialinsäuren/Neuraminsäuren waren in den letzten Jahren Gegenstand eines steigenden Interesses der Forschung und wurden aus verschiedenen Blickwinkeln wissenschaftlich angegangen. Im Rahmen dieser Arbeit wird insbesondere der Themenkomplex Arteriosklerose, Lipoproteine, Apolipoproteine und Apolipoprotein E beleuchtet.

Wie oben dargestellt handelt es sich bei Sialinsäuren um Aminozucker aus Mannosamin und Brenztraubensäure, die als natürliche Bausteine vor allem in neu synthetisierten Gangliosiden, Glykolipoiden und -proteiden im menschlichen Plasma vorkommen. Die Kenntnisse über die Funktionen von Sialinsäuren, bzw. deren Modifikationen verschiedener Interaktionen im menschlichen Organismus sind noch eher gering. Von besonderem Interesse ist deren Bedeutung bei der Entstehung der Arteriosklerose.

Es existieren Arbeiten, die eine signifikante Korrelation vom Sialinsäureserumspiegel mit unterschiedlichen proatherogenen Faktoren wie dem systolischen und diastolischen Blutdruck, dem Cholesterin- und Triglyzeridspiegel, BMI, dem Harnsäurespiegel, dem Glukosespiegel und dem Insulinspiegel beschreiben [68, 69, 70]. Es wurden auch erhöhte Sialinsäurespiegel bei Rauchern und Patienten mit diabetischer Angiopathie festgestellt [68]. Somit zeigt sich somit ein Zusammenhang zwischen dem Sialinsäurespiegel und der Entstehung, bzw. dem Progress von arteriosklerotischen Läsionen. Im Rahmen dieser Arbeit wird besonders auf die Sialisierung von Lipoproteinen eingegangen.

## **1.4.2 Sialisierungen von Lipoproteinen**

Die verschiedenen Lipoproteinklassen liegen in unterschiedlichem Maße sialisiert im Plasma vor. Es zeigt sich ein Gefälle des Sialisierungsgrades von VLDL > IDL > LDL > HDL [71], Während weitere Kenntnisse über die Auswirkungen der Sialisierung bei den meisten Lipoproteinklassen fehlen, war insbesondere der Sialisierungsgrad von Low-Density-Lipoprotein (LDL) bereits Inhalt vieler Veröffentlichungen [72,73,74,75].

### **1.4.2.1. Sialisierungen von LDL**

Im Falle von LDL scheint sich ein erhöhter Sialisierungsgrad als antiarterogen zu erweisen. Es wurde gezeigt, daß die Entfernung von Sialinsäuren von LDL mittels Neuraminidasebehandlung eine verstärkte Interaktion von LDL mit Arterienwandproteoglykanen [72] zur Folge hat, und somit eine Cholesterinanreicherung in Epithelien und Makrophagen [73] wie auch in der glatten Muskulatur von Blutgefäßen [74] begünstigt wird. Es wurde auch berichtet, daß nicht sialisiertes LDL kleiner und dichter als sialisiertes LDL erscheint, stärkere elektronegative Ladung besitzt und dies eine Veränderung von Strukturelementen, wie zum Beispiel der Apolipoprotein B –Tertiärstruktur zur Folge hat [74]. Auf die besondere Bedeutung von kleinen, dichten LDL-Partikeln wird unter 1.5.) näher eingegangen. Auch scheint eine Reduktion des LDL-Sialisierungsgrades mit dem Verlust von  $\alpha$ -Tocopherol verbunden zu sein [74], was wiederum die Oxidabilität von LDL erhöhen und seine Artherogenität steigern könnte. Hierzu paßt die von *Lindbohm et al.* [75] festgestellte Assoziation zwischen dem Sialisierungsgrad von LDL und der Prävalenz einer koronaren Herzerkrankung.

Diese Beobachtungen geben nur einen kleinen Einblick in die komplexen Modifikationsmöglichkeiten des LDL-Stoffwechsels durch Sialinsäuren. Es ist zu erwarten, daß auch die Verstoffwechslung der anderen Lipoproteinklassen nicht unerheblich von deren Sialisierungsgrad beeinflußt wird. Interessant ist auch die scheinbare Gegensätzlichkeit: Sialinsäureerhöhung im Serum scheint mit proatherogenen Zuständen zu korrelieren, während die gesteigerte Sialisierung von LDL antiatherogen wirkt.

## 1.5 Triglyzeride und Arteriosklerose

Dieser Themenkomplex ist für die vorgelegte Arbeit von besonderem Interesse, da Patienten mit versträrkt sialisierem Apolipoprotein E gehäuft hohe Triglyceridspiegel aufweisen [14, 69].

Das Verhältnis zwischen "Triglyzeridreichen Lipoproteinen", postprandialer Lipämie und koronarer Herzkrankheit/Arteriosklerose ist noch nicht vollständig geklärt und wird kontrovers diskutiert. Viele epidemiologische Studien befassten sich mit der Frage, ob erhöhte Serumtriglyzeride einen unabhängigen Risikofaktor für KHK/Arteriosklerose darstellen. Dies gestaltete sich besonders deswegen schwer, weil erhöhte Triglyzeride meist von komplexen metabolischen Veränderungen begleitet werden, und weil die Triglyzeridplasmakonzentration in kurzer Zeit großen Schwankungen unterliegt. Trotzdem konnten zweifelsfrei neuere Studien (*Hokanson et al.* [15]) hohe Triglyzeridspiegel als Risikofaktor - unabhängig von anderen meßbaren Risikofaktoren – identifiziert werden.

Die Verknüpfung von hohen Serumtriglyzeriden mit anderen artherogenen Faktoren kann sich auf drei verschiedenen Ebenen abspielen:

- 1.) Hohe Triglyzeridspiegel weisen auf hohe Konzentrationen von artherogenen "Triglyzeridreichen Lipoproteinen" hin.
- 2.) Hohe Triglyzeridspiegel induzieren diverse andere Lipoproteinabnormitäten, wie kleine, dichte LDL-Partikel (*Pattern B*, LDL III) und niedrige HDL-Spiegel.
- 3.) Hohe Serumtriglyzeridspiegel treten auch oft in Kombination mit Hypertonie, Insulinresistenz und einer erhöhten Gerinnungsneigung auf, welche wiederum eigenständige Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arteriosklerose sind.

Gesondert aufgeführt wird die postprandiale Hyperlipidämie (siehe folgender Punkt 4). Punkt 1) und 2) werden zusammengefaßt als artherogener Lipoproteinphänotyp oder auch als "**lipid triad**" bezeichnet. Treten alle drei oben genannten Punkte gemeinsam auf, spricht man vom "**Metabolischen Syndrom**" oder „**Syndrom X**“ .

### 1.5.1 Triglyzeridreiche Lipoproteine / TG-rich LP

”Triglyzeridreiche Lipoproteine” ist eine Sammelbezeichnung für eine sehr heterogene Stoffklasse. Sie beinhaltet die Chylomikronen und die VLDL (very low-density lipoproteins) sowie deren im Zuge ihrer Verstoffwechslung entstehenden *Remnants*. *Remnants* entstehen durch die Hydrolyse der Triglyceride neu sezernierter Chylomikronen (aus dem Darm) und VLDL (aus der Leber) durch die Lipoproteinlipase (LPL) sowie durch Interaktion mit anderen Lipoproteinen. Während des Katabolismus werden die Lipidzusammensetzung, die Größe und das Apolipoproteinprofil der Ausgangslipoproteine verändert.

Der Großteil der Triglyceride wird durch die Lipoproteinlipase, die primär an Chylomikronen bindet, hydrolysiert und die Fettsäuren werden von peripheren Geweben aufgenommen. Ein weiterer Teil der Triglyceride aus dem Kern wird gegen Cholesterinester der HDL-Fraktion mit Hilfe des Cholesterinester-Transfer-Proteins (CETP) ausgetauscht [98].

Freies Cholesterin wird ebenfalls an die HDL-Fraktion weitergegeben, wo es dann mittels der HDL-assoziierten Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT) verestert und später wieder durch das CETP zurücktransferiert wird. Dies führt zu einer Zunahme des Cholesterinester-Anteils, einer Abnahme des Anteils an Triglyzeriden und zu einer Verkleinerung des HDL-Partikeldurchmessers. Außerdem werden einige Apolipoproteine C und E ausgetauscht.

Die Chylomikronen-*Remnants* werden schnell und komplett von der Leber aufgenommen, wahrscheinlich über einen speziellen Chylomikronen-*Remnant*-Rezeptor, als dessen Ligand Apo E fungiert. Diese Rolle wird dem LDL-receptor related protein (LRP) zugeschrieben [98].

Im Falle der VLDL führt dies entweder zu kleinen VLDL-*Remnants*, die zu zwei Dritteln über den Apo B/E-Rezeptor in die Leber wiederaufgenommen werden, oder sie werden über IDL zu LDL umgebaut. An beiden Vorgängen ist Apo E beteiligt. Die genetisch determinierte Apo E-2-Isoform mit ihren veränderten Eigenschaften verursacht einen gestörten Umsatz mit verlängerten Zirkulationszeiten der *Remnants*. Sie werden stark mit Cholesterinestern und Apolipoprotein E angereichert und als  $\beta$ -VLDL bezeichnet. Kombiniert mit

einigen weiteren Faktoren kann diese genetische Prädisposition zu einer Typ-III-Hyperlipoproteinämie/Dysbetalipoproteinämie führen.

Es wurde nachgewiesen, daß erhöhte  $\beta$ -VLDL-Spiegel oft zur frühzeitigen Entwicklung von Arteriosklerose führen [89]. Bei hohen Triglyzeridkonzentrationen dominieren große VLDL (sf 100-400) mit einer verlangsamten Clearance. Die Ursache hierfür liegt vermutlich an niedrigen HDL-Spiegeln, deren Grund unter Punkt 1.5.2) genauer besprochen wird.

Niedrige HDL-Spiegel erlauben keinen ausreichenden Austausch von Apolipoproteinen. Die Rückgabe von auf den „reuptake“ inhibitorisch wirkendem Apo C-III ist erschwert, die Aufnahme von die LPL aktivierendem Apo C-II ebenfalls. Die dadurch verlängerte VLDL-Zirkulationszeit bedingt wiederum einen verstärkten Austausch von Triglyzeriden gegen Cholesterinester, welche sich im VLDL-Partikel anreichern und eine weitere Verkleinerung der VLDL durch die Lipoproteinlipase verhindern. Diesen großen VLDL-(*Remnant*)-Partikeln werden verschiedene Eigenschaften nachgesagt, die im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Arteriosklerose stehen : *Chung et al.* [16] berichten von einem zytotoxischen und schaumzellbildenden Effekt auf Makrophagenkulturen, wobei sich dieser durch HDL-Cholesterin deutlich hemmen läßt. Die Schaumzellbildung wird dadurch gefördert, daß triglyzeridreiche Lipoproteine, im Gegensatz zu LDL, ohne vorherige Modifikation direkt von Makrophagen aufgenommen werden können (*Bradley, Gianturco* [17], *Tomono et al.* [18]). Schaumzellen spielen also eine Schlüsselrolle in der Frühphase der Entstehung arteriosklerotischer Plaques.

Weiterhin schädigen hypertriglyzeridämische VLDL direkt das Endothel (*Gianturco et al.* [19]). Eine 48stündige Exposition von Endothelzellen aus einer Rinderaorta gegenüber hypertriglyzeridämischer VLDL reduzierte den Bestand an lebenden in Kultur gehaltenen Zellen um etwa 60 %. Eine mögliche Ursache hierfür vermuteten *Zilversmit et al.* [20] in der Lipolyse von TG-reichen Lipoproteinen durch die Lipoproteinlipase an der Arterienoberfläche, die zu einer hohen lokalen Anhäufung von Fettsäureanionen führt, welche wiederum das Endothel schädigen könnten.

Studien von *Nordestgaard* [21] über den Transport von Lipoproteinen in die Hasenaorta zeigten, daß der Influx von kleinen Lipoproteinen am größten ist, die größeren Lipoproteine jedoch am längsten in der Intima zurückgehalten

werden. Dieser verlängerte Aufenthalt größerer Lipoproteine innerhalb der Arterienwand könnte ebenfalls die Entwicklung von Schaumzellen begünstigen.

### **1.5.2 Lipoproteinabnormitäten bei Hypertriglyzeridämie**

Bei HTG wird gehäuft ein **erniedrigter HDL-Spiegel** und das Vorkommen von **kleinen dichten LDL-Partikeln** beobachtet (*Austin et al.* [22], *Richards et al.* [23], *Schaefer et al.* [24]), was als artherogener Lipoproteinphänotyp oder "lipid triad" bezeichnet wird.

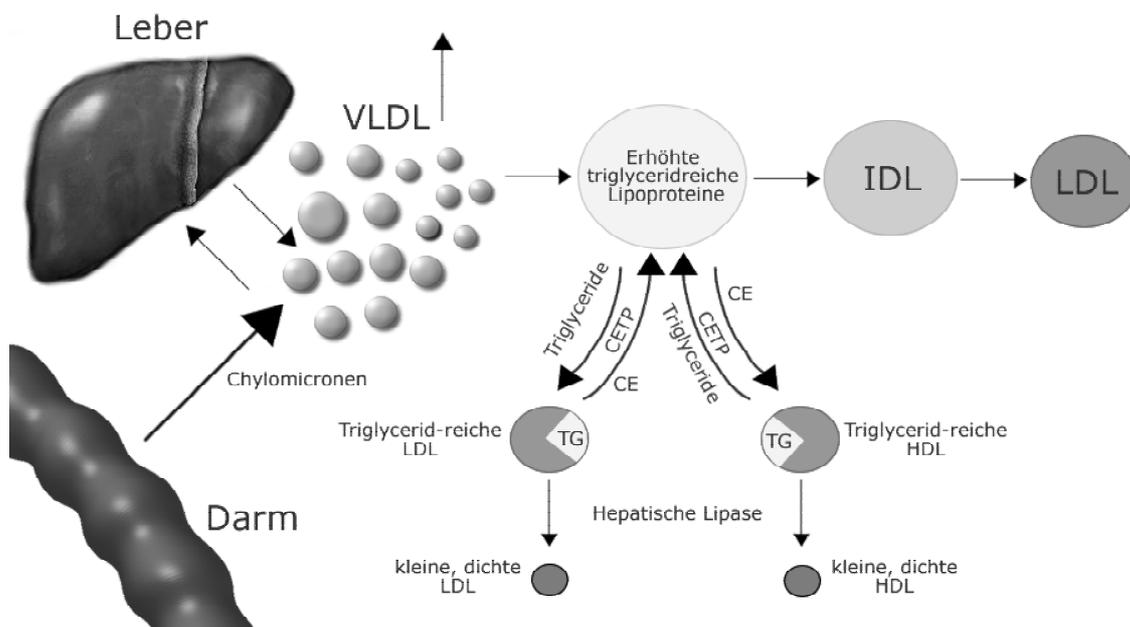
**HDL** wird als naszente HDL von Leber und Dünndarm sezerniert. Diese zunächst scheibchenförmigen Partikel nehmen von peripheren Zellen freies Cholesterin auf, das durch die HDL-assoziierte LCAT verestert und im Kern angereichert wird. Auf diese Weise entstehen größere, sphärische HDL3-Partikel. Diese enthalten relativ wenig freies Cholesterin und können daher weiteres Cholesterin aus peripheren Zellen (reverser Cholesterintransport!) oder aus anderen Lipoproteinen aufnehmen. Die weitere Anreicherung von durch die LCAT gebildeten Cholesterinestern im Kern läßt größere, weniger dichte HDL2 entstehen. Der Anteil an HDL2 bezogen auf die gesamte HDL variiert stark und es wird ihm die größte antiarterogene Wirkung aller HDL-Subspezies (*Johansson et al.* [25]) zugesprochen. Sie können große Mengen unveresterten Cholesterins aufnehmen, verestern und an die Leber zurückführen, die eine der wenigen Ausscheidungsmöglichkeiten von Cholesterin darstellt.

Große HDL2 entstehen durch verstärkte TG-Aufnahme von TG-reichen Lipoproteinen und können durch verschiedene Prozesse, bei denen die hepatische Triglyzeridlipase (HTGL) eine wichtige Rolle spielt, in HDL3 umgewandelt werden. Bei dieser Umwandlung gehen Teile des Apolipoproteins A-1, das für die HDL-Rezeptor-Interaktion und somit für den reversen Cholesterintransport von Bedeutung ist, verloren (*Taskinen* [26]). Das erklärt die Assoziation zwischen erhöhten HDL3-Anteilen und der Progression von Koronarsklerose (*Johansson et al.* [25]). Weiterhin scheinen diese kleineren HDL3 schneller aus der Zirkulation entfernt zu werden und dadurch, sollte ihr Anteil erhöht sein, niedrigere Gesamt-HDL-Level zu verursachen. Niedrige Gesamt-HDL-Level wurden schon in vielen Studien als unabhängiger

Risikofaktor für die Entwicklung einer Arteriosklerose erkannt (*Miller* [27], *Gordon et al.* [28], *Breslow* [29], *Plump et al.* [30]).

Bei einer Hypertriglyzeridämie führt ein verstärkter Austausch von Cholesterinestern und Triglyzeriden zwischen HDL und triglyzeridreichen Lipoproteinen zu großen, TG-reichen HDL2-Partikeln. Diese großen TG-reichen HDL sind ein gutes Substrat für die HTGL, deren Aktivität ohnehin schon bei HTG erhöht ist (*Taskinen* [26], *Blades et al.* [31]). Ein verstärkter Umsatz von TG-reicher HDL2 zu HDL3, ein konsekutives Absinken der Gesamt-HDL-Fraktion und ein letztendlich proatherogener Status lassen sich so erklären.

Die zweite veränderte Lipoproteinklasse, die die "lipid triad" vervollständigt, ist die **LDL**, die bei HTG häufig **abnorm klein und dicht** erscheint. Dieses Phänomen ist, ähnlich wie das der veränderten HDL-Konzentrationen, kausal eng mit der Anwesenheit TG-reicher Lipoproteine verknüpft. Die lange Zirkulationsdauer dieser Partikel (siehe Punkt 1.5.1)) ermöglicht einen erhöhten Austausch von Triglyzeriden und Cholesterinestern durch das CETP, was die Formation großer, TG-reicher LDL-Partikel begünstigt (*Lahdenperä et al.* [32]). Durch die gesteigerte hydrolytische Aktivität der HTGL werden letztendlich die kleinen dichten LDL-Partikel gebildet. Sie haben einen Durchmesser < 25,5nm, eine Dichte zwischen 1,044 und 1,063 g/ml (*Lahdenperä et al.* [32]) und werden auch als Pattern B-LDL oder LDL-III bezeichnet. *Austin et al.* [33] berichteten, daß sie schon gehäuft ab einer Serum-TG-Konzentration von 1,6 mmol/l (150 mg/dl) beobachtet werden.



**Abbildung 8** Einfluß erhöhter Triglyceride auf die LDL- und HDL- Fraktion  
(CE: Cholesterinester, CETP: Cholesterinester- Transferprotein)

Es wurde gezeigt, daß der Katabolismus dieser kleinen dichten LDL langsamer als normal verläuft (*Nigon et al.* [34]), was an einer Apo-B-Konformationsänderung und somit einer geringeren Rezeptoraffinität liegen könnte (*Galeano et al.* [35]). Die daraus resultierende längere Zirkulationszeit ermöglicht einen erhöhten Influx in die Arterienwand (*Nigon et al.* [34]), der aufgrund seiner Größenabhängigkeit ohnehin schon kleinere Lipoproteine verstärkt betrifft (*Nordestgaard et al.* [21]). Innerhalb der Arterienwand werden die kleinen dichten LDL verstärkt an Arterienwandproteoglykane (APG), besonders an Chondroitinsulfat unter Bildung von APG-LDL-Komplexen, gebunden (*Anber et al.* [36]). Diese verstärkte Interaktion scheint auch auf veränderte Konformation des Apo B zurückzuführen zu sein. Dies führt zu einer verlängerten Verweildauer und begünstigt Oxidation, Schaumzellbildung und somit die Entwicklung von Arteriosklerose. Da die Resistenz gegenüber oxidativen Modifikationen ohnehin bei kleinen dichten LDL schon herabgesetzt ist (*Chait et al.* [37], der Grund wird in der Abnahme der lipidlöslichen Antioxidantien, bes. Vitamin E, vermutet), muß mit einer zusätzlich erhöhten LDL-Oxidationsrate gerechnet werden. Oxydierte LDL sind Liganden für die *Scavenger-Rezeptoren* der Makrophagen und können die Bildung von Schaumzellen verursachen.

Alles in allem erhöhen kleine, dichte LDL als artherogene Subklasse das Risiko für eine KHK/Arteriosklerose ( *Austin et al.* [38], *Krauss* [39] ).

### **1.5.3 Das Metabolische Syndrom**

Das "Metabolische Syndrom" ist ein Überbegriff für die Koexistenz von der "lipid triad", Insulinresistenz, Hypertonus und einer erhöhten Gerinnungsneigung (*Grundy* [40]). Als Synonym wird auch "**Syndrom X**" verwendet.

Multiple Faktoren tragen zur Entstehung eines Metabolischen Syndroms bei. Einige dieser Faktoren sind: Adipositas, körperliche Inaktivität, fettreiche Diät und eine genetische Prädisposition. Es wird öfter im höheren Alter beobachtet, wobei es bevorzugt das männliche Geschlecht betrifft.

Als pathogenen Mechanismus stellt man sich vor, daß eine erhöhte Anzahl an Fettzellen zu Hyperinsulinämie und Insulinresistenz führt, deren Folge Dyslipoproteinämie und Hypertonie ist (*Kaplan* [41]).

Der **Diabetes mellitus** und die Hypertonie sind schon als eigenständige Risikofaktoren für die Entwicklung einer KHK/Arteriosklerose etabliert. In der Framingham-Kohorte war das KHK-Sterberisiko bei Diabetikern doppelt so hoch wie bei Nichtdiabetikern und nicht vollständig mit dem Auftreten anderer Risikofaktoren zu erklären (*Keys* [43]).

Für die **Hypertonie** als einer der wichtigsten Faktoren, die zur Entwicklung einer Arteriosklerose/KHK beitragen, besteht ein kontinuierlich mit den Blutdruckwerten ansteigendes Risiko (*Levy* [44]).

Da die **erhöhte Gerinnungsneigung** in direkter Verbindung mit der Anwesenheit TG-reicher Lipoproteine zu stehen scheint, wird auf diesen Zusammenhang hier genauer eingegangen. Theoretisch könnte eine erhöhte Gerinnungsneigung die Artherogenese beschleunigen und einen sich ereignenden Infarkt durch verstärkte Thrombosierung verschlimmern. Ein gesicherter Zusammenhang zwischen einer erhöhten Gerinnungsneigung und einer vorzeitigen Arteriosklerose ist jedoch noch nicht etabliert.

Weitere bekannte Auswirkungen von hohen Plasmatriglyzeriden oder TG-reichen Lipoproteinen:

Es besteht eine positive Korrelation zwischen Plasmatriglyzeridspiegeln und der Aktivität von Prokonvertin/Faktor VII (*Miller et al.* [45]), das/der am Anfang der extrinsischen Gerinnungskaskade steht. Zusätzlich sind größere, TG-reiche Partikel an der Konversion von einkettigem Faktor VII in dessen voll aktive, zweikettige  $\alpha$ -VIIa-Form beteiligt (*Mitropoulos et al.* [46]). Auch wird ein verringerter Katabolismus von Faktor VII bei hohen TG-Werten vermutet (*De Sousa et al.* [47]). Für die entsprechende Aktivitätserhöhung von Faktor VII bei HTG wurde eine Assoziation mit der KHK in der Northwick Park Heart Study gezeigt (*Meade et al.* [48]).

Ein weiterer Effekt auf die Blutgerinnung ist die VLDL-stimulierte Sekretion von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) (*Sitko-Rahm et al.* [49]). Dies erklärt die beobachtete positive Korrelation zwischen TG-Levels und Levels von PAI-1 (*Hamsten et al.* [50]), welche zu gesenkten Plasminspiegeln und somit zu einer verminderten Fibrinolyse führen.

Große TG-reiche Partikel beinhalten einen beträchtlichen Anteil des Plasmaphospholipidpools. Sie können als Phospholipidquelle für die Konversion von Prothrombin zu Thrombin dienen (*Bradley et al.* [51], *Bajaj et al.* [52]) und Ursache einer verstärkten Plättchenaggregation in vitro sein (*Knöfler et al.* [53]).

#### **1.5.4 Postprandiale Hypertriglyzeridämie**

Verschiedene Studien deuten an, daß eine postprandiale Lipämie ein unabhängiger Risikofaktor für die Artherogenese darstellt (*Karpe et al.* [54], *Ebenbichler et al.* [55], *Patsch et al.* [56]). Personen mit angiographisch gesicherter KHK haben erhöhte postprandiale Spiegel an Chylomikronen-*Remnants* (*Simpson et al.* [57]). Da Chylomikronen per se nicht artherogen sind, muß ein anderer kausaler Zusammenhang hergestellt werden. Chylomikronen und ihre *Remnants* kompetieren mit anderen TG-reichen Lipoproteinen um die gleichen Abbauvorrichtungen (LPL, B/E-R) der Leber (*Karpe et al.* [54], *Cohn* [58]). Die Chylomikronen sind bevorzugtes Substrat der LPL. Dies führt zu verlängerten Zirkulationszeiten, besonders der VLDL-Partikel.

Postprandiale Lipämien als passagere Hypertriglyzeridämien scheinen kurzfristig und reversibel dieselben Effekte wie eine permanente HTG zu haben. Man durchläuft also nach jeder Mahlzeit einen kurzen proarterogenen Zustand.

# Arteriosklerose

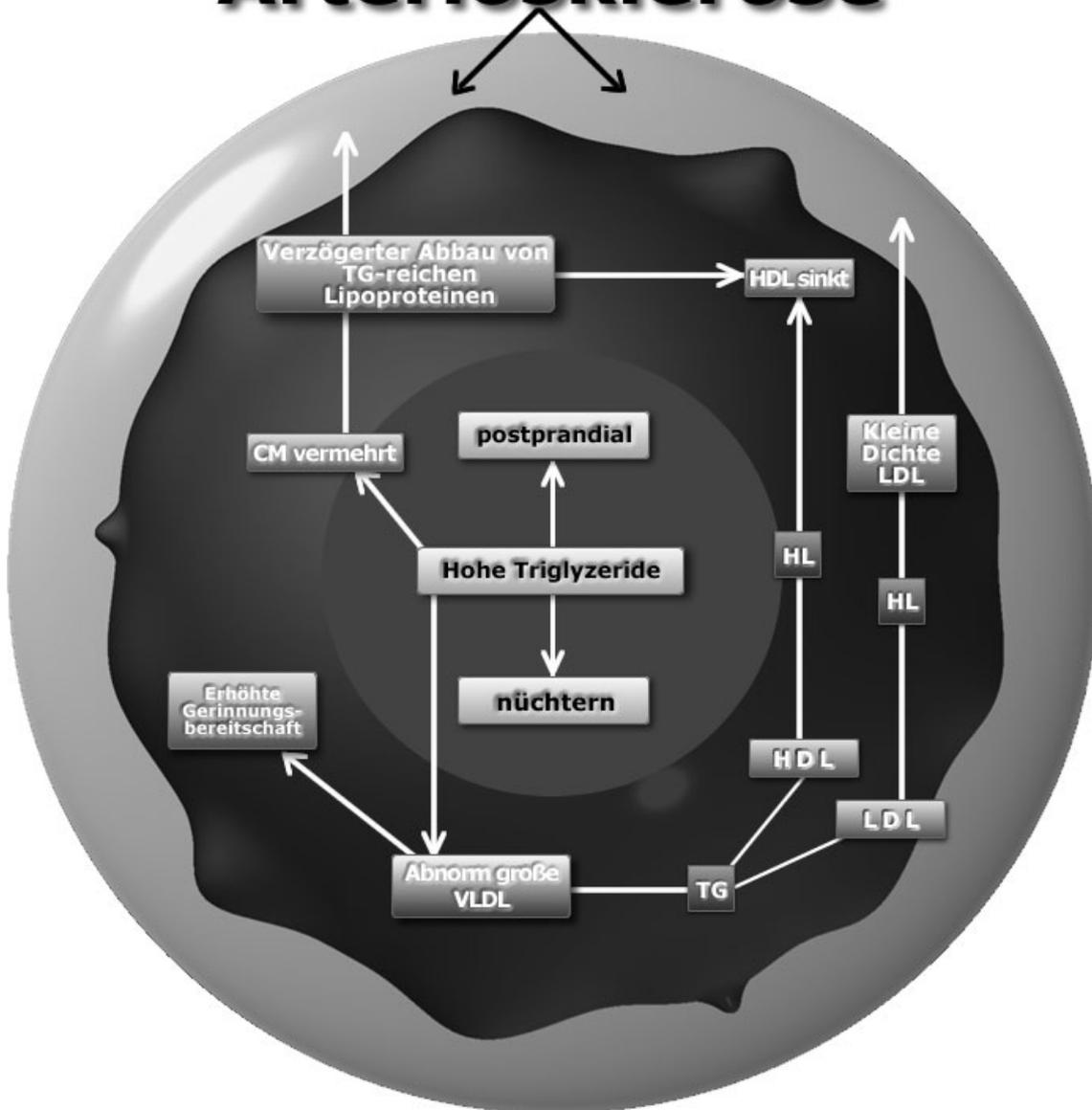


Abbildung 9 Schematische Darstellung eines Blutgefäßquerschnittes sowie der proatherogenen Stoffwechselfvorgänge bei Hypertriglyceridämie (HL: hepatische Lipase, TG: Triglyceride, CM: Chylomikronen)

## 2. Fragestellung

Aufgabe dieser Arbeit ist es, Zusammenhänge zwischen dem Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E und bestimmten Stoffwechselfparametern im menschlichen Plasma aufzuzeigen.

Insbesondere sollte der Frage nachgegangen werden, ob und gegebenenfalls wie Hyperlipoproteinämien die Sialisierung von Apolipoprotein E beeinflussen.

Hierfür wurden die Apolipoprotein E- Sialisierungsgrade densitometrisch vor und nach Behandlung mit Neuraminidase quantifiziert, Korrelationen berechnet und die Ergebnisse diskutiert.

### **3. Materialien**

#### **3.1 Patientenplasma**

Es wurden pro Patient jeweils 10 ml venöses Blut durch Punktion der Kubitalvene gewonnen. Dieses wurde auf zwei mit EDTA beschichtete Röhrchen verteilt und vorsichtig mehrfach gekippt. Sodann wurden die beiden Röhrchen umgehend in der Heraeus Sepatech Biofuge A bei 4 °C und 2500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluß wurde das Plasma in nicht vorbehandelte Kunststoffröhrchen abpipettiert und bis zur weiteren Verwertung in einem Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Dabei wurde darauf geachtet, daß zwischen Probengewinnung und Weiterverarbeitung nicht mehr als 24 Stunden vergingen. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Probengewinnung mindestens 14 Stunden nüchtern.

#### **3.2. Neuraminidase**

Sigma Nr. 2133: Neuraminidase Typ X von Clostridium perfringens dialysiertes und lyophilisiertes Pulver, Proteingehalt ca. 85 %, Aktivität: ca. 250 U/mg Protein

#### **3.3. Reagentien und Standardseren**

Cholesterin-Reagenz CHOD-PAP-Methode	Boehringer, Mannheim
Triglycerid-Reagenz Methode: Enzymatische Spaltung der Triglyzeride mit nachfolgender Bestimmung des entstandenen Glycerins.	Boehringer, Mannheim
Folin-Ciocateus-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Precinorm (Chol. und TG)	Boehringer, Mannheim
Precipath (Chol. und TG)	Boehringer, Mannheim
Pool-Plasma	in unserem Labor hergestellt
Standard-Plasma für Apo E ELISA	Behring, Marburg

### 3.4 Antikörper

Goat Anti Rabbit-Peroxidase (GARPO) Ig	Jackson Immuno Research Lab., Hamburg
Monoklonaler Anti Apo E Ig aus EE7-Zelllinie der Maus	in unserem Labor hergestellt
Polyklonaler (Rabbit Anti Human) Anti Apo E	DAKO, Hamburg

### 3.5 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampholine (Servalyt, pH: 4-6)	Pharmacia Biot., Freiburg
Ampholine (Servalyt, pH: 5-7)	Pharmacia Biot., Freiburg
Aqua ad inj.	Braun, Melsungen
1,2 Benzoldiamin-Dihydrochlorid (OPD)	Sigma, Deisenhofen
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chlor-Naphtol Tabl.	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citric-Acid Monohydrate	Merck, Darmstadt
Decylsulfat	Serva, Heidelberg
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Kaliumbromid	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat (0,5 %)	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (0,1n)	Merck, Darmstadt
Natriumkaliumtartrat (0,02 %)	Merck, Darmstadt
Natriumkarbonat (2 %)	Merck, Darmstadt
Orthophosphorsäure (99 %)	Merck, Darmstadt
Perhydrol (30 %)	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt

Sodiumdodecylsulfat (SDS)  
Tetramethylethyldiamin (TEMED)  
Tris  
Tween 20

Serva, Heidelberg  
Serva, Heidelberg  
GIBCO BRL, Karlsruhe  
Serva, Heidelberg

### **3.6. Häufig verwendete Lösungen und Puffer**

Blottingpuffer A :	45 g NaCl, 12,1 g Tris, 5 g Tween 20 lösen in 5 l Aqua dest. pH 7.4 mit 1m HCl einstellen
Blottingpuffer B : DS	2,5 g Natriumdesoxycholat (0,25 %), 1 g (1 %) mit 1 l Blottingpuffer A auffüllen
Kammerblottingpuffer :	12,1 g Tris, 56,2 g Glycin lösen in 4 l Aqua dest. mit 1 l Methanol auffüllen
Unterpuffer für IEF :	4,9 g Orthophosphorsäure lösen in 5 l Aqua dest.
Oberpuffer für IEF :	50 ml 2M NaOH auf 5 l mit Aqua dest. auffüllen
Probenpuffer für IEF	6 g Tris, 18 g Harnstoff lösen in 50 ml Aqua dest. Zugabe von 0,5 g Decylsulfat pH einstellen auf pH 9
BSA-Lösung :	5 g Rinderserumalbumin lösen in 100 ml Blottingpuffer A
Lösung B für : Enzympuffer	1,14 g $K_2HPO_4$ lösen in 50 ml Aqua dest.
Enzympuffer für Neuraminidase	1,36 g $KH_2PO_4$ , 14,8 mg $CaCl_2$ lösen in 100 ml Aqua dest. mit Lösung B auf pH 5,4 einstellen
PBS Stocklösung (10x)	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , 2 g $KH_2PO_4$ lösen mit 1 l Aqua dest., pH 7,4 einstellen
ELISA Blockingpuffer	1 g BSA lösen in 100 ml PBS (pH 7,4) Zugabe von 50 $\mu$ l Tween 20

ELISA Waschpuffer	250 µl Tween 20 lösen in 250 ml PBS (pH 7,4)
ELISA Citratpuffer	243 ml 0,1M Citric Acid Monohydrate + 257 ml 0,2M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> lösen in H <sub>2</sub> O bidest.
ELISA Substratlösung	30 mg OPD lösen in 75 ml Citratpuffer pH 5,0 Zugabe von 15 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)
ELISA Stopplösung	3M Schwefelsäure
SDS Lowry Lösung A	2 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,02 % Natriumkaliumtartrat in 0,1n NaOH
SDS Lowry Lösung B	0,5 % CuSO <sub>4</sub> , 5 % SDS in 0,1n NaOH
SDS Lowry Lösung C	Lösung A + B im Verhältnis 50 +1
SDS Lowry Lösung D	Folin-Reagenz + Aqua dest. im Verhältnis 1+1
Dichtelösung für Dichtegradienten	Grundlösung (Dichte 1,006) : 9 g NaCl, 1,21 g Tris auffüllen auf 900 ml mit Aqua dest. pH auf 8,6 mit HCl einst., auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen. Stammlösung (Dichte 1,352) Die Formel zur Berechnung des Mischungsverhältnisses (500 ml Grundlösung + X ml Stammlösung ergibt die Dichte Y) lautet : $500 \cdot 1,006 + X \cdot 1,352 = 500 \cdot Y + X \cdot Y$

### **3.7. Weitere Materialien**

Bechergläser  
Beckmann Ultrazentrifugenröhrchen 331372 12 ml Volumen  
Dichtespindeln 1,300-1,360, 1,000-1,060, 1,060-1,120  
Einmalspritzen 5 ml, 10 ml  
Erlenmeyerkolben  
Filterpapier  
Küvetten  
Meßzylinder 50 ml, 100 ml, 1000 ml, 5000 ml  
Pipettenspitzen : blau, gelb und weiß  
Reagenzglasstände  
Silikongel  
Spezialkanülen

### **3.8 Geräte**

Beckmann Fraction Recovery System  
Beckmann L7 Ultrazentrifuge  
Beckmann Ultrazentrifugenrotor SW 41  
Bio-Rad Laboratories Fokussierkammer  
Bio-Rad Laboratories Blottingkammer  
Bio-Rad Laboratories Power-Supply 500/200  
Dynatech Laboratories MRX Microplate Reader  
Eppendorf Diluter 5213  
Eppendorf Photometer 6118  
Eppendorf Pipetten 1000, 200, 20 µl  
Finntip Multipette  
Heidolph Heizrührer  
Heidolph Whirlmix  
Heraeus Inkubator  
Heraeus Sepatech Biofuge A  
Hettich Rotana/RP Tischzentrifuge  
Hitachi 150/20 Spectrophotometer  
Sartorius Laboratories Tischwaage

## **4. Methoden**

### **4.1 Patientenrekrutierung**

Alle Patienten (n =15, 12♂/3♀, durchschnittliches Alter: 49,3 ±14,1Jahre) waren wegen einer gemischten Hyperlipoproteinämie mit durchschnittlichen Cholesterinwerten von 296,6 ±132mg/dl und Triglyceriden von 455,4 ±386,2mg/dl bei einem BMI von 27,46 ±5,3kg/m<sup>2</sup> in der Fettstoffwechselambulanz der Poliklinik der Inneren Medizin (Leiter: Prof. Dr. U. Beil) der Universitätskliniken Hamburg Eppendorf bekannt. Ausgewählt wurden solche Patienten, die im Rahmen einer routinemäßigen Apolipoprotein-E-Phänotypisierung mittels Isoelektrischer Fokussierung durch mehr oder minder ausgeprägte Zusatzbanden aufgefallen waren. Bei sechs Patienten war eine koronare Herzerkrankung vorbeschrieben, alle Patienten hatten normale (<110mg/dl) Nüchternblutzuckerwerte.

### **4.2 Neuraminidasebehandlung**

Von dem Serum jedes Probanden wird ein doppelter Versuchsansatz gemacht: Es wird in zwei  $\gamma$ -Counterröhrchen 200  $\mu$ l (Serie A) bzw. 220  $\mu$ l (Serie B) des Enzympuffers für Neuraminidase pipettiert. Anschließend werden jeweils 2  $\mu$ l Serum hinzugefügt. Zu allen Proben der Serie A werden je 20  $\mu$ l Neuraminidase gegeben. Die Proben der Serie B erhalten keinen Enzymzusatz. Die so vorbereiteten Röhrchen werden mit Kunststoffstopfen verschlossen und je 20 Sekunden mit Hilfe eines Whirlmixers vermischt und in einem auf 37 °C vorgeheizten Inkubator für 2 Stunden inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit werden alle vorbehandelten Seren zwei mal delipidiert. Dazu wird zunächst in jedes Röhrchen ein 2,5 ml Chlor/Methanol-Gemisch (je 8 Teile Chloroform und 5 Teile Methanol) pipettiert und die Lösung dann 5 Min. auf einem Tischrüttler homogenisiert, bei 2500 U/Min. 10 Min. lang zentrifugiert und der klare Überstand schließlich mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und verworfen. Der verbleibende Rest im Röhrchen wird ein zweites Mal der gleichen Prozedur - wie oben beschrieben - unterzogen.

Der jetzt noch verbleibende Rest wird anschließend mit Stickstoff begast (getrocknet). Verschluss jedes Röhrchens mit einem Kunststoffstopfen und Einfrieren bei  $-40^{\circ}\text{C}$ .

### **4.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Zunächst wird die Gellösung für ein Gel angesetzt. Hierfür wird 0,1 g Bisacrylamid, 3,75 g Acrylamid und 24 g Harnstoff in einen skalierten Erlenmeyerkolben gegeben und dieser daraufhin bis zur 45 ml-Marke mit Aqua dest. gefüllt, ein Magnetrührstab zugegeben und das Gefäß mit Parafilm verschlossen. Der fertige Ansatz wird nun unter leichter Wärmezufuhr auf einem Magnetrührer bis zu seiner völligen Aufklärung (ca. 45 Min.) vermischt. Inzwischen wird in die Röhrchen mit den vorbehandelten Patientenseren (siehe 4.2) jeweils 120  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (gefärbt mit etwas Bromphenolblau) und 5  $\mu\text{l}$  Mercaptoethanol pipettiert. Daraufhin werden sie mit einem Kunststoffstopfen verschlossen, auf dem Whirlmixer 5 Sekunden vermischt und für 30 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank aufbewahrt. Während dessen wird die Fokussierkammer mit Unterpuffer gefüllt und das Kammergestell vorbereitet. Zur nun aufgeklärten Gellösung werden Ampholine (je 1,5 ml pH 4-6 und pH 5-7) gegeben und der Erlenmeyerkolben mit Aqua dest. bis zur 50 ml Markierung ergänzt. Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  TEMED und 60  $\mu\text{l}$  einer Ammoniumpersulfatlösung (0,18g auf 1 ml Aqua dest.), kurzes Vermischen und zwischen Glasplatten des Kammergestells gießen, Kamm einsetzen und ca. 45 Min. aushärten lassen. Entfernen des Kamms, Umbau der Kammer, Oberpuffer einfüllen und je 110  $\mu\text{l}$  der vorbereiteten Proben in die entsprechenden Taschen pipettieren. Das Kammergestell wird nun in der Fokussierkammer plziert, die Kammer geschlossen und Strom dergestalt angeschlossen (18 Std. 250 Volt, 2 Std. 500 Volt), daß ein Stundenvoltprodukt von mindestens 4800 resultiert. Nun folgt der Vorgang des Blottens gemäß der standardisierten Vorgehensweise des Biochemischen Stoffwechsellabors der Universitätskliniken Hamburg Eppendorf.

Anschließend werden die Nitrocelluloseblots mit 100 ml BSA-Lösung für 30 Min. geblockt und daraufhin 20  $\mu\text{l}$  des polyklonalen anti-Apo E Ig zugegeben. Inkubation bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht. Waschen der Blots mit

Blottingpuffer ( A 2 Min., B 10 Min., B 10 Min., A 2 Min.). Nun erfolgt die weitere Inkubation mit 100 µl GARPO in 100 ml BSA-Lösung. Erneutes Waschen und anschließende Entwicklung der Blots:

2 Chlor-Naphtol Tabletten in 20 ml Methanol lösen, 100 ml PBS-Puffer und 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugeben, mischen und zu den vorbereiteten Nitrocelluloseblots geben. Sobald Bande gut sichtbar, mit Wasser die Reaktion stoppen, Blots trocknen und im Dunkeln aufbewahren.

### 4.3.1 Auswertung der Blots

Zur Auswertung wird das Programm "Molecular Analyst" verwendet. Hierzu werden die Blots gescannt und die optische Dichte der Banden ermittelt und quantifiziert (Volumen der optischen Dichte mal mm<sup>2</sup>). Pro Bande und Proband wird jeweils mit der gleichen Fläche gemessen, so daß letztlich für die Bewertung nur das Volumen der optischen Dichte relevant ist. Der Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E wird also nach exakter elektrophoretischer Verifizierung des Apo E-Phänotyps als der prozentuale Anteil der Flächeninhalte der densitometrierten Sialobanden am densitometrisch ermittelten Gesamtflächeninhalt aller Banden des Apo E-Spektrum ausgedrückt.

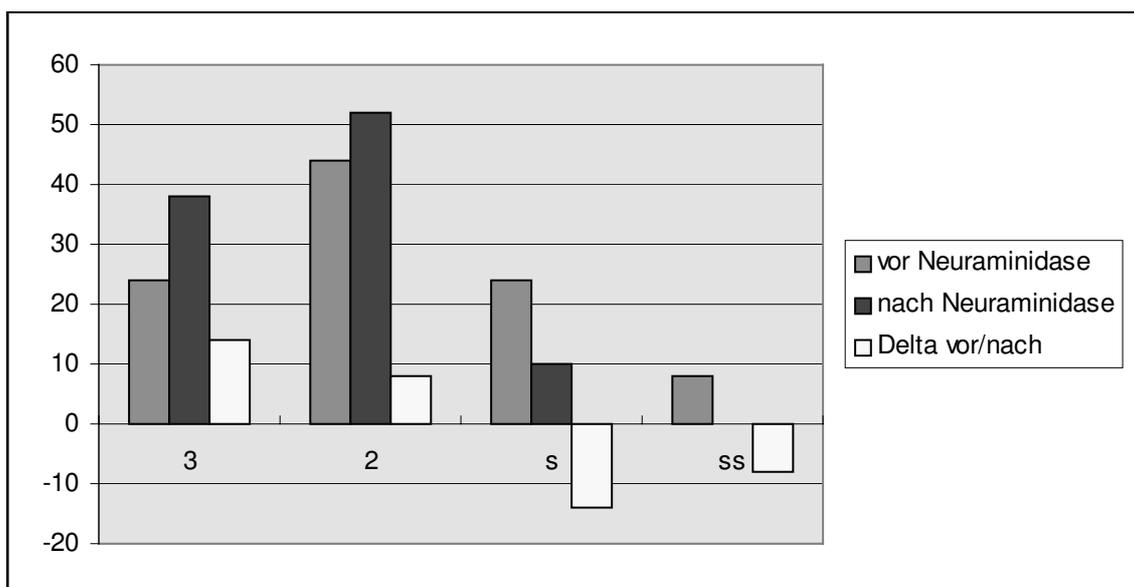


Abbildung 10: Darstellung der densitometrischen Auswertung einer Apo E Phänotypisierung (hier Apo E2/3-Genotyp, s bzw. ss = Extrabanden durch ein- oder zweifach sialisiertes Apo E

## **4.4 Dichtegradienten**

Mit Hilfe der Ultrazentrifugation können auf einen Dichtegradienten aufgetragene Proteingemische entsprechend der verschiedenen Sedimentationskoeffizienten aufgetrennt werden. Dieses Prinzip macht man sich auch bei der Auftrennung der verschiedenen Lipoproteinsubfraktionen aus dem Serum zu Nutzen.

Zur Erstellung eines Dichtegradienten werden zunächst 4 ml vom jeweiligen Serum mit 1,31 g KBr auf die Dichte 1,21 eingestellt. Nun wird ein Beckmann-Zentrifugenröhrchen (12 ml) folgendermaßen beschickt: 2 ml Aqua ad inj. auf den Grund des Röhrchens und dann 3,5 ml 1,019 Dichtelösung, 3 ml 1,063 Dichtelösung und zuletzt 3,5 ml des vorbereiteten Serums mit Hilfe einer Kanüle unterschichten. Die Röhrchen werden in einem Rotor plaziert und bei 38000 rpm für 20 Stunden bei 4 °C zentrifugiert. Zum Fraktionieren werden die Zentrifugenröhrchen in einen Fraktionierer geschraubt, von unten angestochen und deren Inhalt in 0,5 ml Portionen in nummerierte Röhrchen getropft. Daraufhin werden die Cholesterin- und Triglyzeridwerte jeder Fraktion bestimmt.

### **4.4.1 Auswertung der Gradienten, Herstellung von Plasmapools**

Die ermittelten Triglyzerid- und Cholesterinwerte aller Fraktionen eines Gradienten werden auf der Y-Achse eines Koordinatensystems eingetragen, wobei die Gradientenfraktionen die X-Achse markieren.

Nach der so entstehenden Kurve werden die den entstandenen Cholesterin-„Peaks“ jeweils zugehörigen Fraktionen zusammenpipettiert („gepoolt“). Die Lokalisation eines jeden „Peak“ in dem Koordinatensystem ist jeweils spezifisch für eine bestimmte Lipoproteinklasse. Von den „gepoolten“ Fraktionen jeder Klasse wird eine höchstmögliche Anzahl von 200 µl Aliquots bei -80 °C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

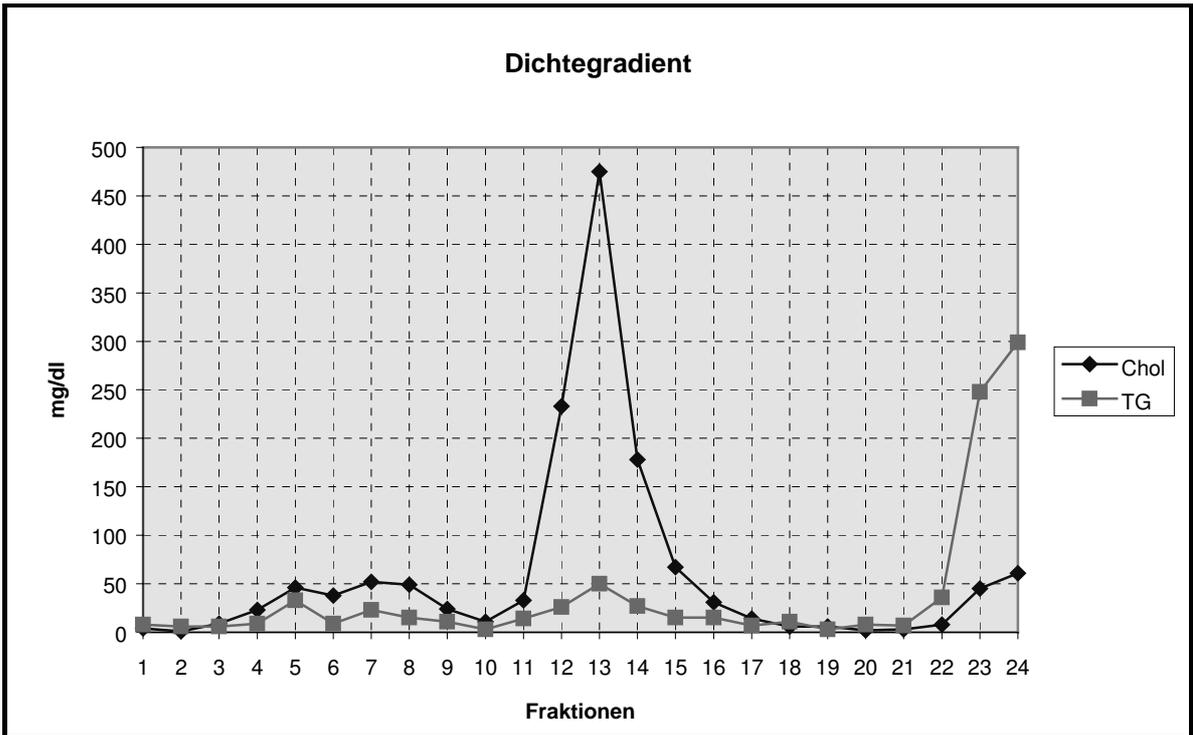


Abbildung 11 Beispiel einer graphischen Darstellung eines Dichtegradienten bei Apo E Typ 3/3

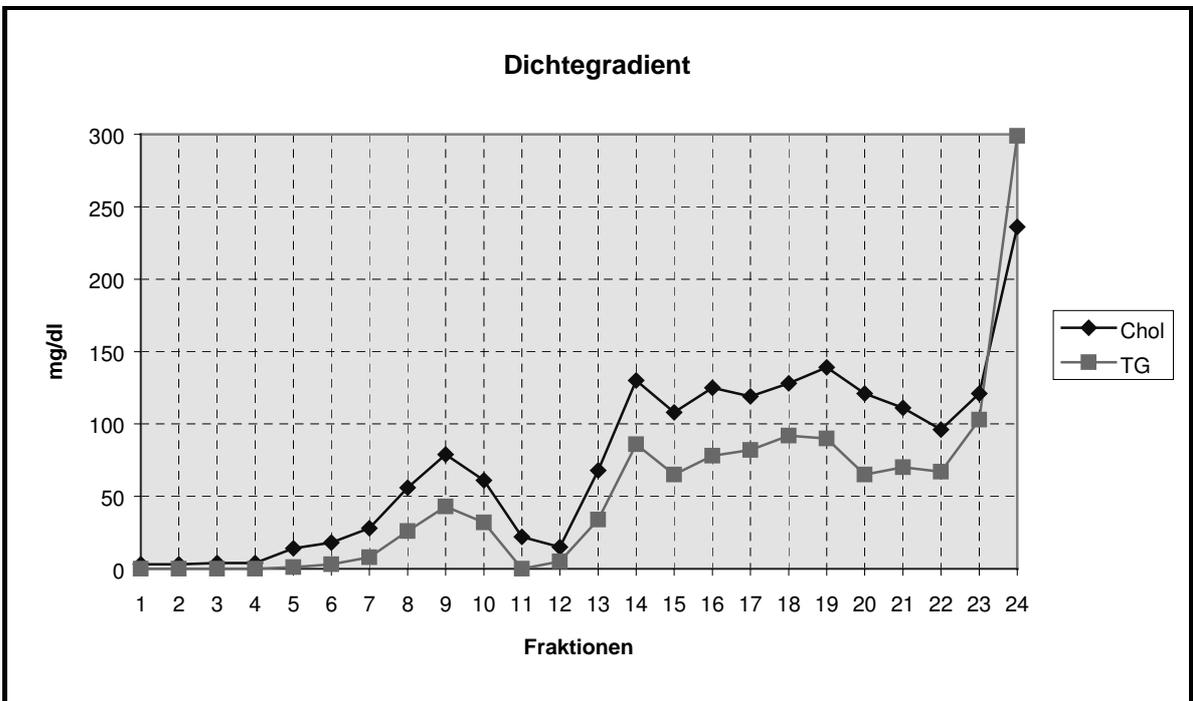


Abbildung 12 Beispiel einer graphischen Darstellung eines Dichtegradienten bei Dysbetalipoproteinämie, Apo E Typ E 2/2

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen typische graphische Darstellungen von Dichtegradienten nach Auftrennung der Lipoproteine mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation. Während Abbildung 10 ein normales Muster zeigt ( Fraktion 4/5/6: HDL3, Fraktion 6/7/8/9: HDL2, Fraktion 11/12/13/14: LDL, Fraktion 15/16: IDL, Fraktion 22/23/24: VLDL), entspricht Abbildung 11 dem typischen Erscheinungsbild der Dysbetalipoproteinämie bei Apo E-Genotyp 2/2 (Fraktion 5/6: HDL3, Fraktion 8/9/10: HDL2, Fraktion 13/14: LDL, Fraktion 15-22  $\beta$ -VLDL, 23/24: TG-reiche Lipoproteine).

#### **4.5 Apo E-Genotypisierung**

Der Apolipoprotein-E-Genotyp wurde routinemäßig mittels Restriktionsanalyse amplifizierter DNS in einem angeschlossenen Laboratorium ermittelt.

## **4.6 Nachweisverfahren**

### **4.6.1 Cholesterinbestimmung**

Der Cholesteringehalt wird mit einem Reagenz der Firma Boehringer Mannheim nach der CHOD-PAP-Methode durchgeführt.

Zum Erstellen eines Bestimmungsansatzes werden 0.02 ml der entsprechenden Probe mit 2 ml der Reagenzlösung in einer Küvette (1 cm Schichtdicke) vermischt und bei Raumtemperatur mind. 30 Minuten, max. aber 60 Min. inkubiert. Zur Kontrolle der Richtigkeit wird bei jeder Meßreihe Precinorm und Precipath mitbestimmt. Die Messung wird im Photometer bei Hg 546 nm durchgeführt, wobei jede Meßreihe gegen einen Reagentienleerwert erfolgen muß. Die Konzentration (c, in mg/dl) des Cholesterins errechnet sich nach:  $c = 853 \times \text{Extinktion der Probe}$ .

### **4.6.2 Triglyzeridbestimmung**

Die Triglyzeridbestimmung erfolgt mit einem Reagenz der Firma Böhlinger Mannheim. Sie erfolgt durch enzymatische Spaltung der Triglyzeride mit nachfolgender Bestimmung des entstandenen Glycerins. Zum erstellen eines Bestimmungsansatzes werden 0,02 ml der entsprechenden Probe mit 2 ml der Reagenzlösung in einer Küvette (1 cm Schichtdicke) vermischt und bei Raumtemperatur mind. 30 Minuten, max. aber 60 Min. inkubiert. Zur Kontrolle der Richtigkeit wird bei jeder Meßreihe Precinorm und Precipath mitbestimmt. Die Messung wird im Photometer bei Hg 546 nm durchgeführt, wobei jede Meßreihe gegen einen Reagentienleerwert erfolgen muß.

Zur Berechnung der Konzentration (c, in mg/dl) wird die Extinktion der Probe mit 1040 multipliziert. Zur Berücksichtigung des freien Glycerins werden von jedem errechneten TG-Wert 10 mg/dl abgezogen.

### **4.6.3 Proteinbestimmung (SDS-Lowry)**

Es wird eine Verdünnungsreihe des Albumin Standards der Firma PIERCE (2 mg/ml) mit 0,1n NaOH erstellt (0,125, 0,25, 0,5, 1 und 2 mg/ml), HDL muß mit

0,9 % NaCl-Lösung auf 1:50 verdünnt werden. Alle Standards und Proben werden mit 20 µl eingesetzt und mit 0,1n NaOH auf 100 µl aufgefüllt. Für den Leerwert werden 0,1n NaOH verwendet. Zu allen Röhrchen wird nun 1 ml frisch angesetzte Lösung C pipettiert, anschließend gevortext und die Proben 10 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird bei gleichzeitigem Vortexen je 100 µl der Lösung D zugegeben, 30 Min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und im Spektralphotometer bei 760 nm die Extinktion gemessen. Zur Auswertung wird der Konzentrationsfaktor mit jeder Extinktion multipliziert. Er ist der Mittelwert aus Konzentration geteilt durch Extinktion aus den gemessenen Standardwerten.

#### **4.6.4 Apo E ELISA (Enzymimmunoessay)**

Zur Bestimmung der Apo E-Gesamtkonzentration im Plasma wird zunächst eine Mikrotiterplatte mit monoklonalem Anti Apo E beschichtet. Hierzu werden 100 µl einer Lösung aus 10 ml PBS und 7 µl des monokl. Anti Apo E in jedes Well pipettiert und die mit Plate Seals versiegelte Mikrotiterplatte bei 4 °C für 16-18 Stunden inkubiert. Dann wird die Mikrotiterplatte dreimal mit je 150 µl Waschpuffer pro Well gewaschen und anschließend mit 150 µl Blockingpuffer bei 37 °C für eine Stunde geblockt.

Die Proben werden mit Blockingpuffer folgendermaßen verdünnt: HDL (1:800), LDL (1:400), IDL (1:400), VLDL (1:800), β-VLDL (1:800), TG-rich LP bei HLP III (1:1000), Gesamtplasma (1:6000) und mit je 100 µl pro Well (Doppelwerte) aufgetragen. Weiterhin wird eine Pool-Plasma-Standardreihe mit den Konzentrationen 0,064 µg/ml, 0,032 µg/ml, 0,016 µg/ml, 0,008 µg/ml, 0,004 µg/ml, 0,002 µg/ml, 0,001 µg/ml und eine Standardreihe der Firma Behring mit den Konzentrationen 0,05 µg/ml, 0,025 µg/ml, 0,0125 µg/ml, 0,006 µg/ml erstellt und ebenfalls mit je 100 µl pro Well (Doppelwerte) aufgetragen.

Die beschichtete Platte wird wieder mit Plate Seals versiegelt und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erneutes Waschen wie beschrieben und Zugabe des polyklonalen Anti Apo E. Dieser wird in Blockingpuffer 1:10000 verdünnt und dann mit je 100 µl dieser Lösung pro Well aufgetragen, die Platte

mit Plate Seals versiegelt und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dem Waschen folgt nun die Inkubation mit *Goat Anti Rabbit-Peroxidase human absorbiert* (GARPO), welche mit Blockingpuffer 1:7500 verdünnt und mit 100 µl pro Well aufgetragen wird. Die Inkubationszeit bei 37 °C beträgt eine Stunde, woraufhin die Platte wieder dreimal gewaschen wird. Zugabe von 200 µl Substratlösung pro Well und Platzierung der Mikrotiterplatte im Dunkeln. Die Entwicklung wird nach etwa 10 Min. (wenn der Pool-Standard der Konzentration 0,064 µg/ml Zitronengelb ist) mit 50 µl 3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Well gestoppt und die Extinktion bei 490 nm mit dem Microplate Reader gemessen, welcher auch die Eichkurve erstellt und die endgültigen Konzentrationen (in µg/ml) errechnet.

#### **4.6.5 Lp(a), Apo A-I- und Apo B<sub>100</sub>-Massenbestimmung**

Diese Werte wurden routinemäßig nephelometrisch in einem angeschlossenen Laboratorium ermittelt.

#### **4.6.6 LpL-Aktivitätsbestimmung**

Die LPL-Aktivität wurde von Mitarbeitern des Biochemischen Stoffwechsellabors durch einen LPL-Aktivitätsassay (Referenz nach Nilsson-Ehle, P., 1977, *Artery* 3 194-209) bestimmt. Leider war dieser Wert nicht für alle Probanden verfügbar.

#### **4.6.7 Glukosebestimmung**

Die Plasmaglukosespiegel wurden routinemäßig im Zentrallabor der Universitätskliniken Eppendorf nach der Glukose-6-P-Dehydrogenase-Methode bestimmt.

## **5. Ergebnisse:**

### **5.1 Grundlegende Vorbemerkungen :**

Zum Verständnis der Interpretation der Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung des Sialisierungsgrads von Apolipo-protein E vor und nach Neuraminidasebehandlung sind folgende grundlegende Vorbemerkungen wichtig:

Um die Korrelation zwischen verschiedenen Fettstoffwechselfparametern und der Masse an sialisiertem Apolipoprotein E im Plasma zu quantifizieren, wurde im Rahmen der Auswertung von folgenden Überlegungen ausgegangen :

1) Unter identischen Versuchsbedingungen spaltet die jeweils eingesetzte konstante Menge (gleiche Konzentration und gleiches Volumen) Neuraminidase bei Substratsättigung pro Zeiteinheit immer die gleiche Menge N-Acetylneuraminsäure vom Apolipoprotein E-Molekül ab. Apolipoprotein E wurde in unterschiedlichen Konzentrationen bei jeweils gleichem Volumen eingesetzt. Um das Substratangebot auf das Enzym anzupassen, wurde soweit notwendig- vorverdünnt .

2) Bleiben nach der Desialisierung von Apolipoprotein E mittels Neuraminidase keine oder nur gering ausgeprägte sialisierte Extrabanden in der IEF sichtbar, spricht dies für einen primär vergleichsweise geringen Apo E-Sialisierungsgrad; bleibt hingegen bei gleichen Voraussetzungen nach Neuraminidasebehandlung der Anteil an sialisierten Extrabanden in der IEF wenig oder gar unverändert, so muß ein vergleichsweise größerer Anteil von Apolipoprotein E sialisiert gewesen sein.

3) Da in dieser Arbeit der densitometrisch ermittelte prozentuale Anteil der sialisierten Extrabanden vom Gesamtbandenmuster in der IEF und dessen Veränderung vor und nach Neuraminidasebehandlung, nicht aber die absolute Sialo-Apolipoprotein E-Masse bestimmt wurde, bedeutet dies:

Unter der Voraussetzung identischer Bedingungen für die Neuraminidasebehandlung der jeweiligen Patientenserien besteht eine negative Korrelation zwischen der prozentualen Veränderung des Flächenanteils (bezogen auf die Auswertung der gescanten Blots) von sialisiertem Apo E vor/nach Neuraminidasebehandlung und der Masse des sialisierten Apo E im Plasma.

Praktisch bedeutet dies: Je weniger sich die Sialo-Apo E-Masse nach jeweils identisch durchgeführter Desialisierung mittels Neuraminidase reduziert, um so mehr Sialo- Apo E muß primär vorhanden gewesen sein.

## Patient 1

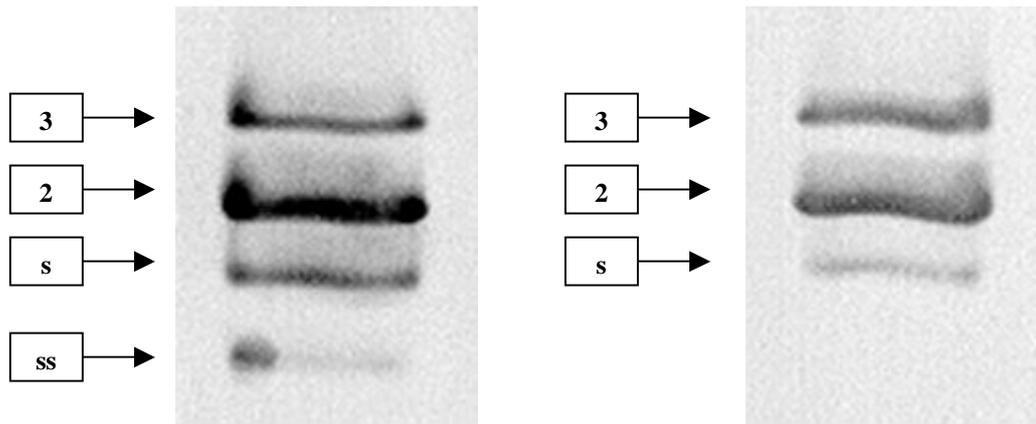


Abbildung 13 IEF von Patient 1 vor/nach Desialisierung

Tabelle 5 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
1	2/3	3	24	38
		2	44	52
		s	24	10
		ss	8	0

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

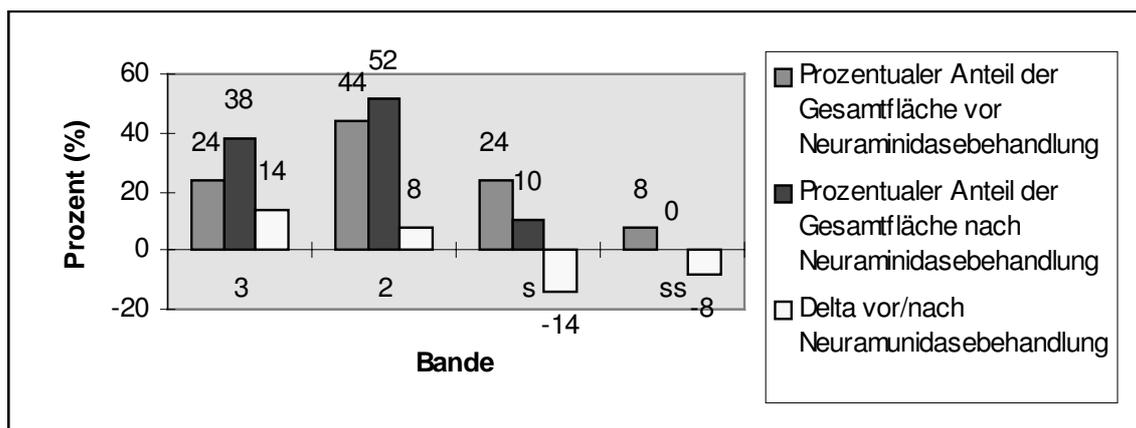


Abbildung 14

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:24%→10%, ss:8%→0%, gesamt: 32%→10%) ergibt sich eine **Desialisierung um 68,75 %**.

## Patient 2

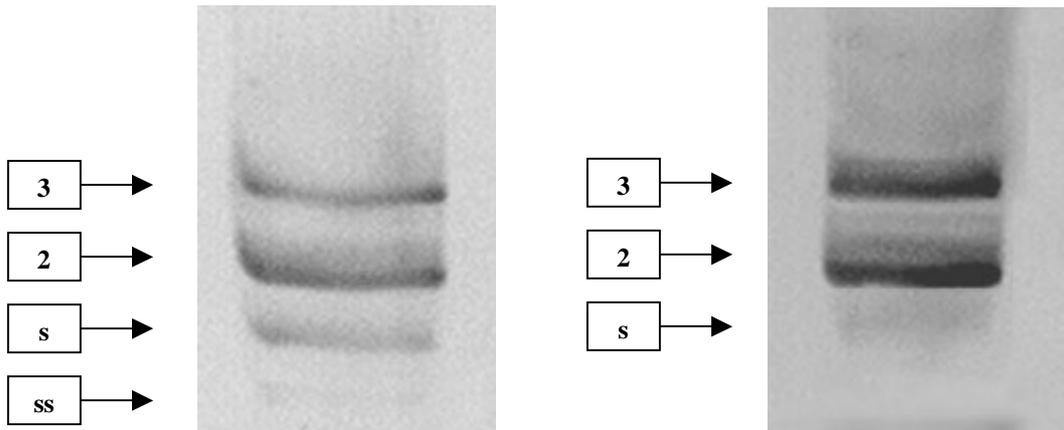


Abbildung 15 IEF von Patient 2 vor/nach Desialisierung

Tabelle 6 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
2	2/3	3	34	43
		2	40	46
		s	22	11
		ss	4	0

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

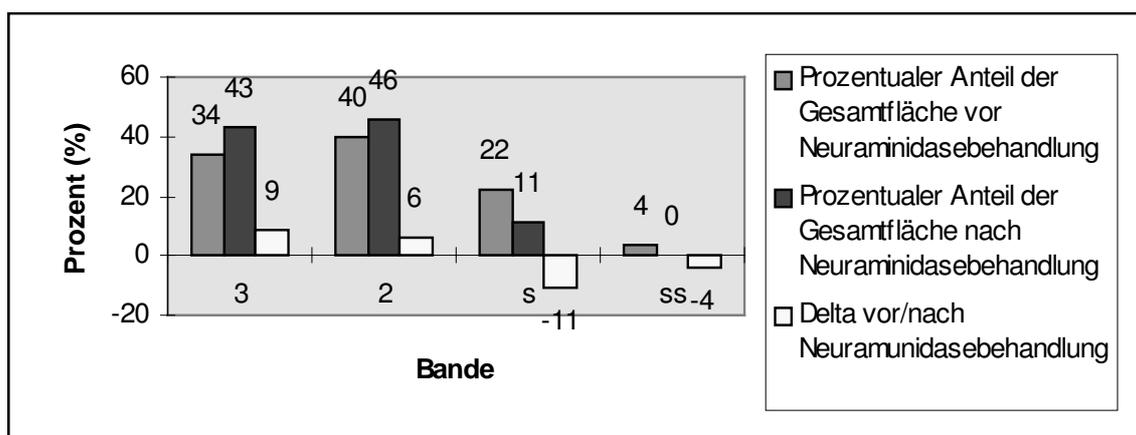


Abbildung 16

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:22%→11%, ss:4%→0%, gesamt: 26%→11%) ergibt sich eine **Desialisierung um 57,68 %**.

### Patient 3

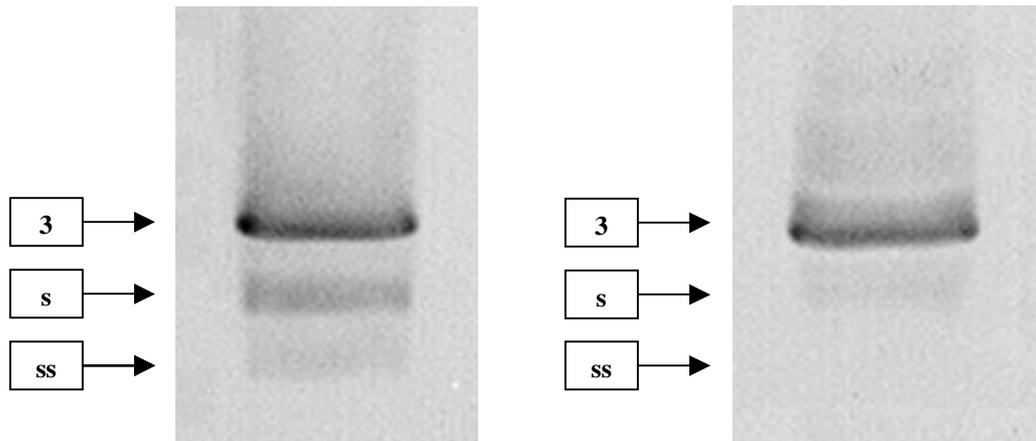


Abbildung 17 IEF von Patient 3 vor/nach Desialisierung

Tabelle 7 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
3	3/3	3	61	86
		s	29	13
		ss	10	1

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

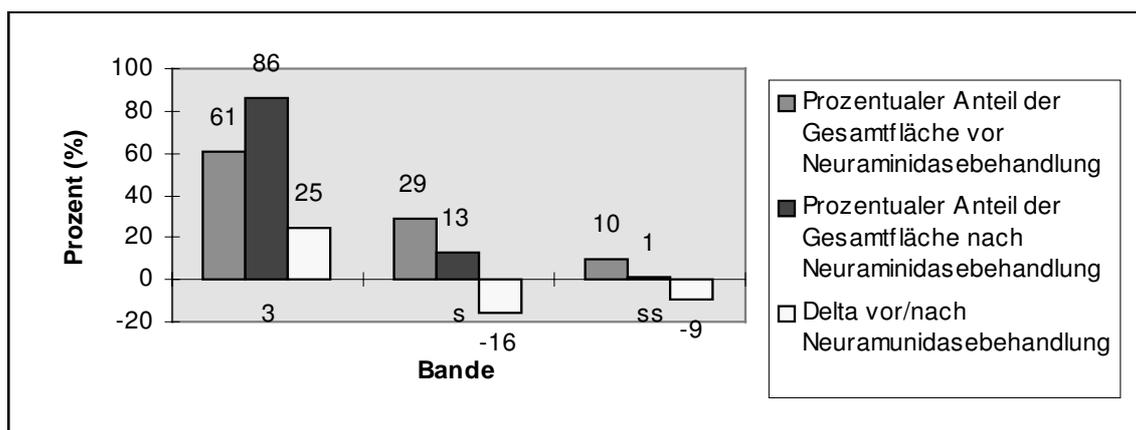


Abbildung 18

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:29%→13%, ss:10%→1%, gesamt: 39%→14%) ergibt sich eine **Desialisierung um 64,10 %**.

## Patient 4

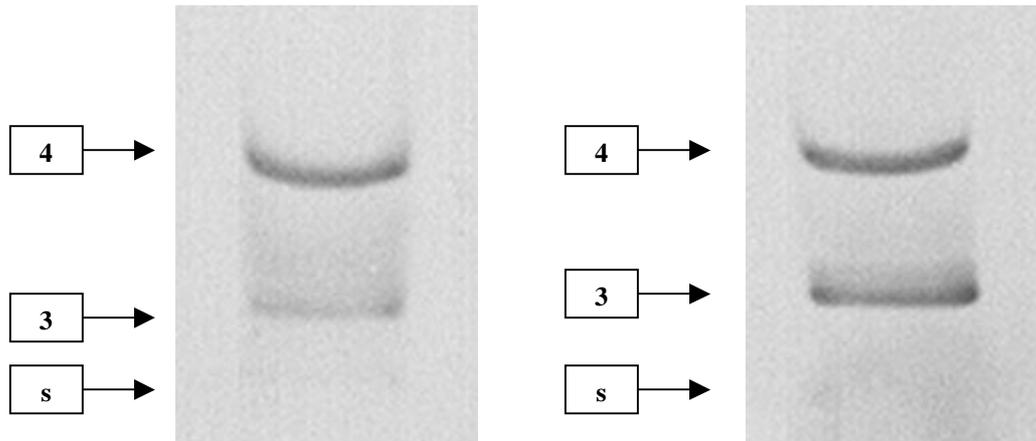


Abbildung 19 IEF von Patient 4 vor/nach Desialisierung

Tabelle 8 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
4	3/4	4	39	55
		3	46	38
		s	19	7

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

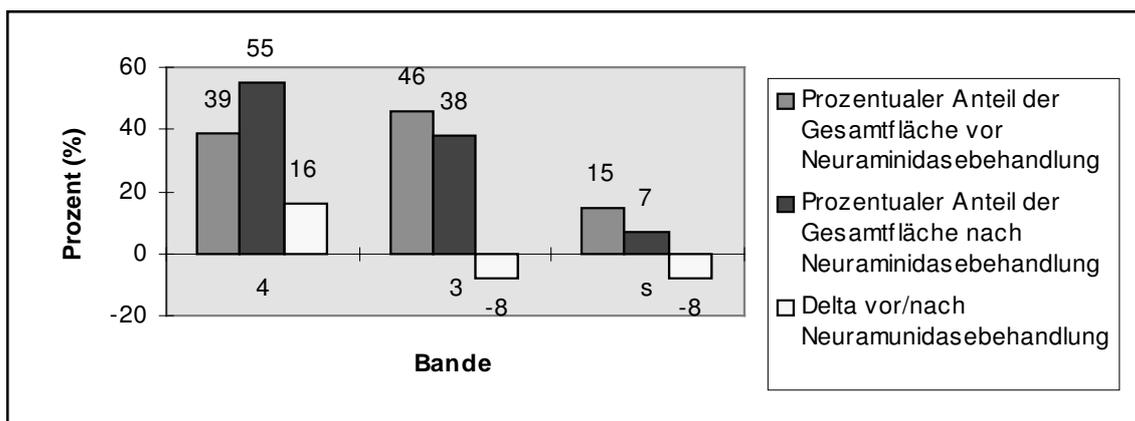


Abbildung 20

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:19%→7%) ergibt sich eine **Desialisierung um 69,57%**.

## Patient 5

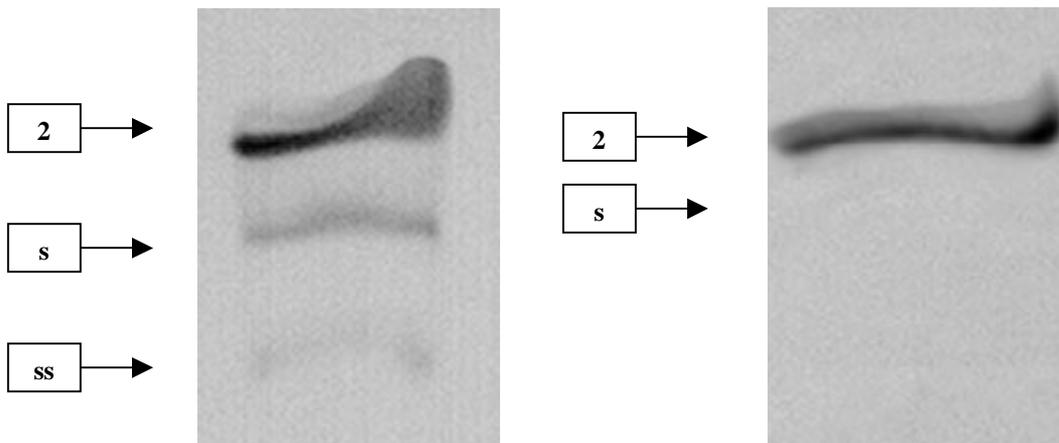


Abbildung 21 IEF von Patient 5 vor/nach Desialisierung

Tabelle 9 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
5	2/2	2	64	92
		s	28	8
		ss	8	0

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

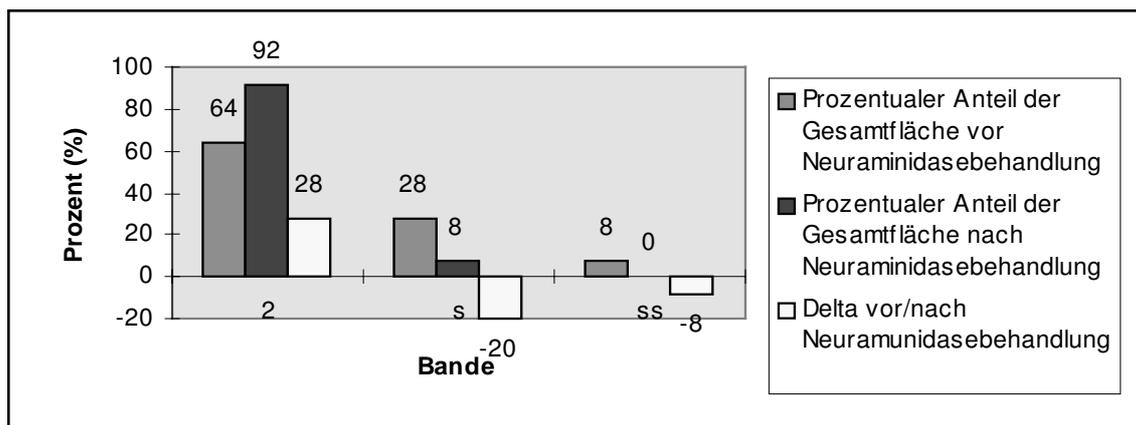


Abbildung 22

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:28%→8%, ss:8%→0%, gesamt: 36%→8%) ergibt sich eine **Desialisierung um 77,78%**. Da das Plasma 1:1 mit isotoner NaCl-Lösung verdünnt war, beträgt die tatsächliche Reduktion der sialisierten Extrabanden nur 50% des errechneten Wertes (**38,89 %**)

## Patient 6

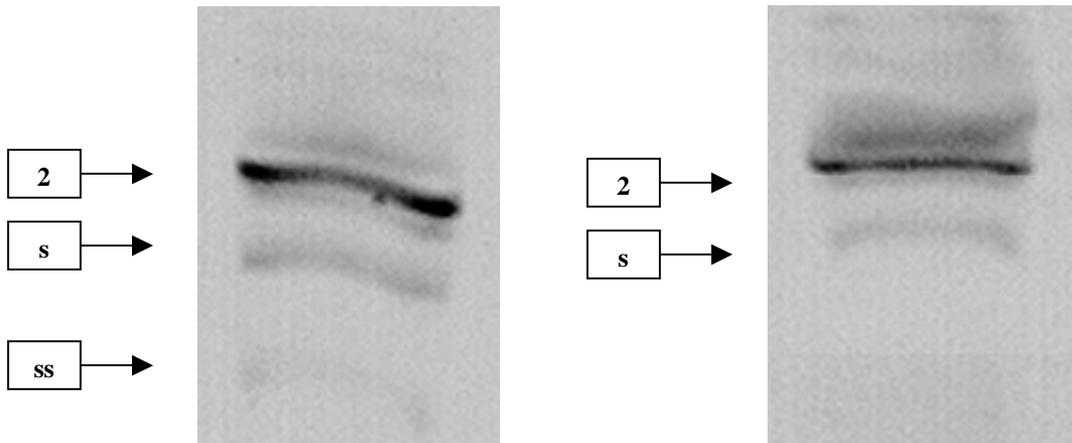


Abbildung 23 IEF von Patient 6 vor/nach Desialisierung

Tabelle 10 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
6	2/2	2	69	87
		s	24	13
		ss	7	0

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

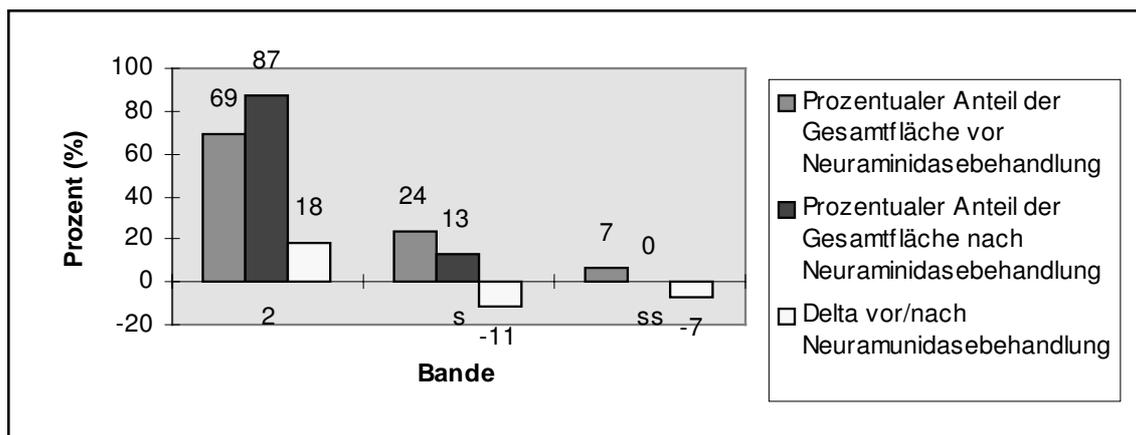


Abbildung 24

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:24%→13%, ss:7%→0%, gesamt: 31%→13%) ergibt sich eine **Desialisierung um 58,05%**. Da das Plasma 1:1 mit isotoner NaCl-Lösung verdünnt war, beträgt die tatsächliche Reduktion der sialisierten Extrabanden nur 50% des errechneten Wertes (**29,03 %**)

## Patient 7

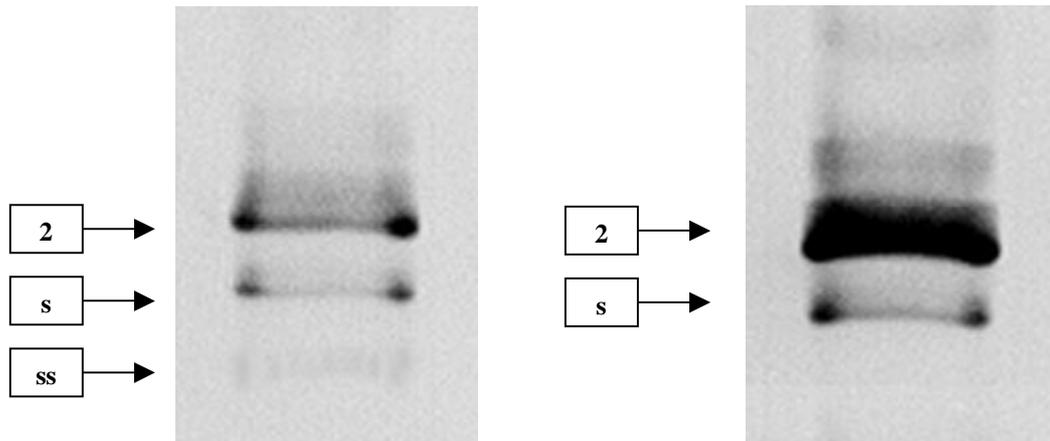


Abbildung 25 IEF von Patient 7 vor/nach Desialisierung

Tabelle 11 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
7	2/2	2	77	82
		s	22	18
		ss	1	0

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

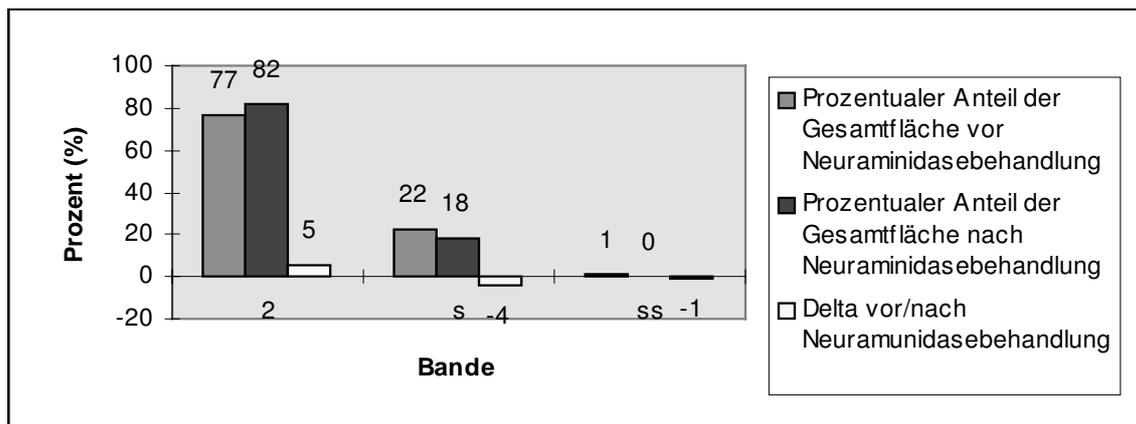


Abbildung 26

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:22%→18%, ss:1%→0%, gesamt: 23%→18%) ergibt sich eine **Desialisierung um 21,73%**. Da das Plasma 1:3 mit isotoner NaCl-Lösung verdünnt war, beträgt die tatsächliche Reduktion der sialisierten Extrabanden nur 25% des errechneten Wertes (**5,42 %**)

## Patient 8

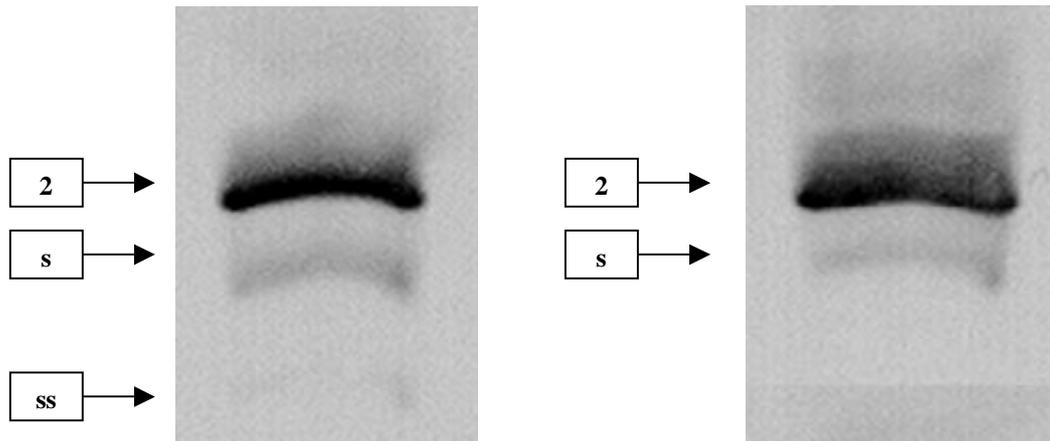


Abbildung 27 IEF von Patient 8 vor/nach Desialisierung

Tabelle 12 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
8	2/2	2	76	88
		s	22	12
		ss	2	0

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

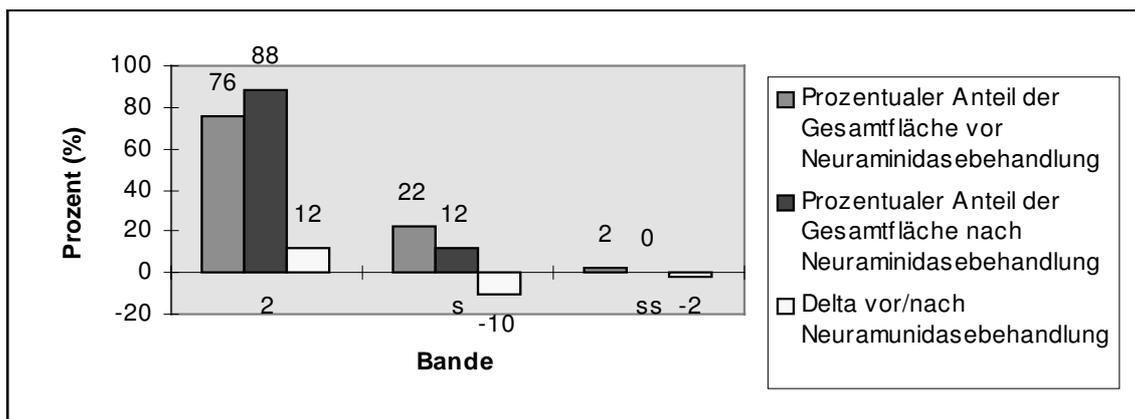


Abbildung 28

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:22%→12%, ss:2%→0%, gesamt: 24%→12%) ergibt sich eine **Desialisierung um 50%**. Da das Plasma 1:2 mit isotoner NaCl-Lösung verdünnt war, beträgt die tatsächliche Reduktion der sialisierten Extrabanden nur 33,33% des errechneten Wertes (**16,66 %**)

## Patient 9

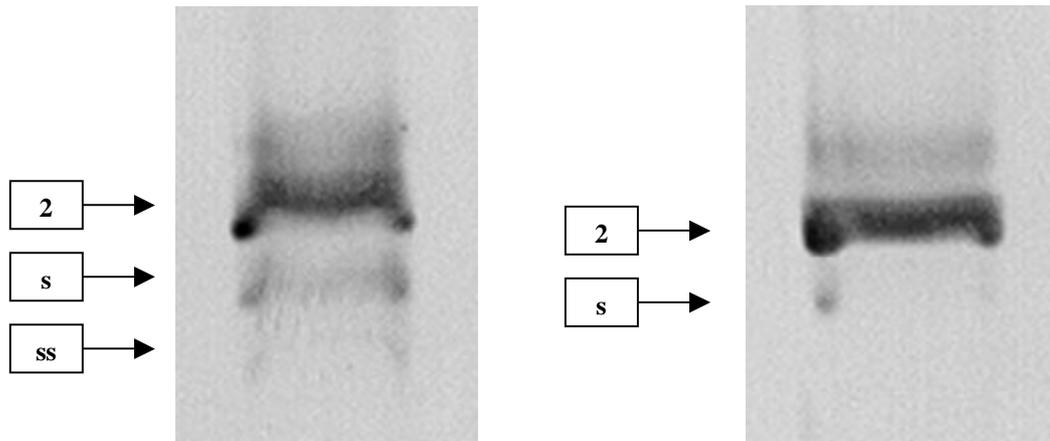


Abbildung 29 IEF von Patient 9 vor/nach Desialisierung

Tabelle 13 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
9	2/2	2	79	96
		s	20	4
		ss	1	0

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

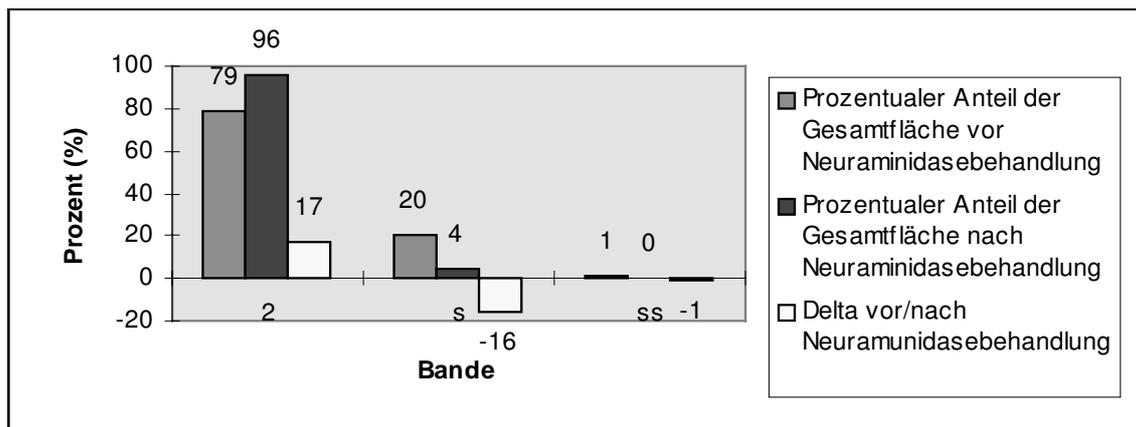


Abbildung 30

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:20%→4%, ss:1%→0%, gesamt: 21%→4%) ergibt sich eine **Desialisierung um 80,94%**. Da das Plasma 1:2 mit isotoner NaCl verdünnt war, beträgt die tatsächliche Reduktion der sialisierten Extrabanden nur 33,33% des errechneten Wertes (**26,98 %**)

## Patient 10

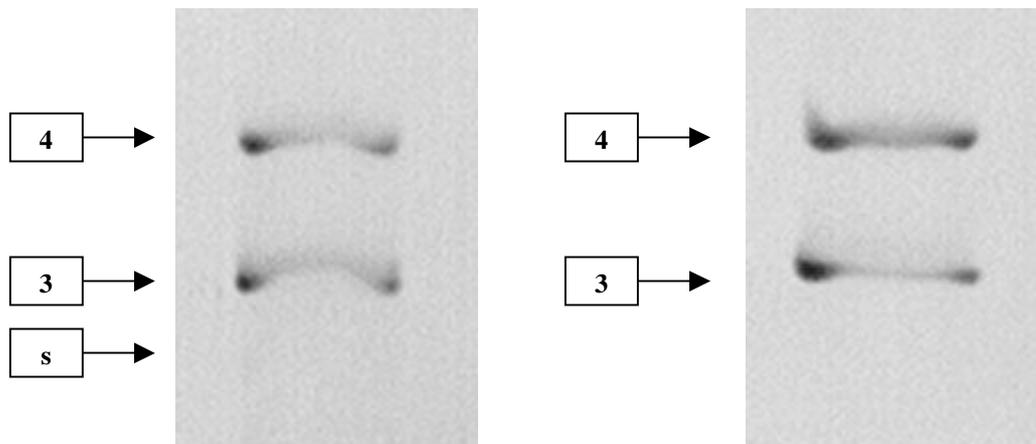


Abbildung 31 IEF von Patient 10 vor/nach Desialisierung

Tabelle 14 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
10	3/4	4	46	56
		3	53	44
		s	1	0

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

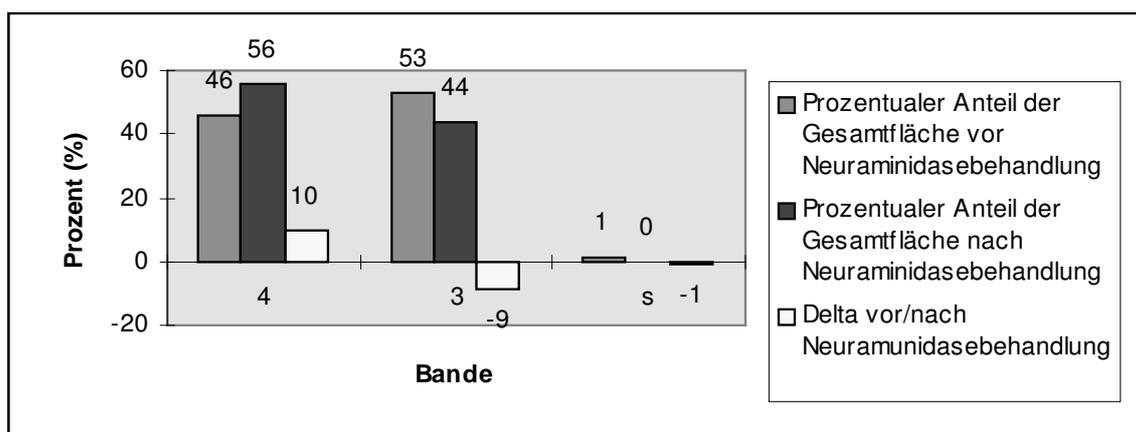


Abbildung 32

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:1%→0%) ergibt sich eine **Desialisierung um 100 %**.

## Patient 11

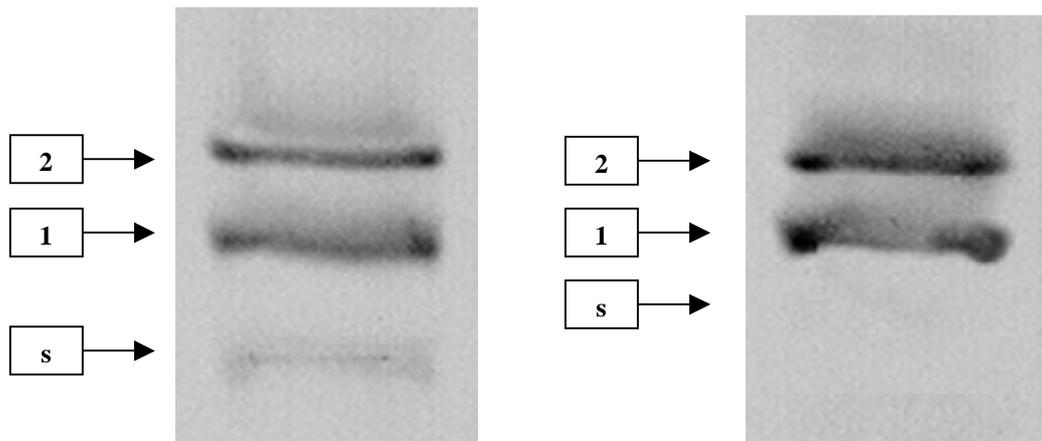


Abbildung 33 IEF von Patient 11 vor/nach Desialisierung

Tabelle 15 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
11	1/2	2	38	54
		1	48	45
		s	14	1

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

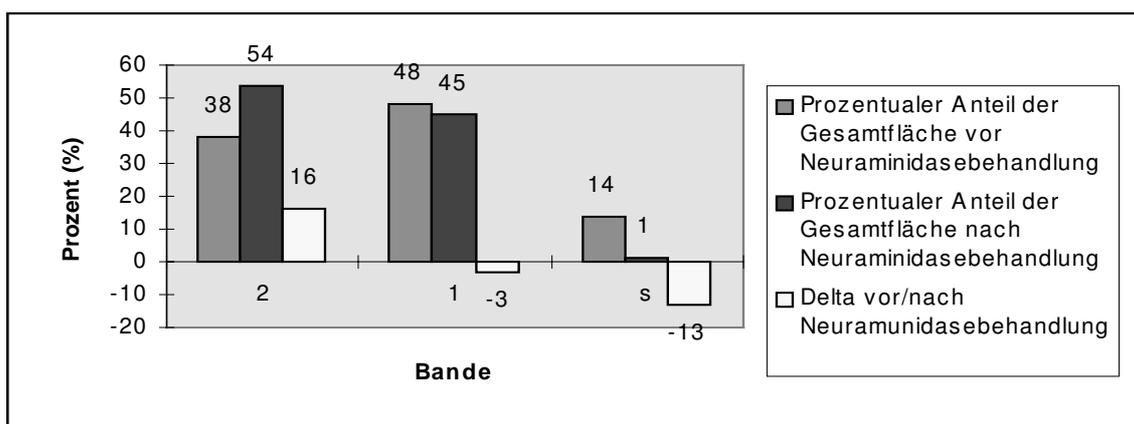


Abbildung 34

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:14%→1%) ergibt sich eine **Desialisierung um 94,11 %**. Da das Plasma 1:1 mit isotoner NaCl verdünnt war, beträgt die tatsächliche Reduktion der sialisierten Extrabanden nur 50 % des errechneten Wertes (**47,06 %**)

## Patient 12

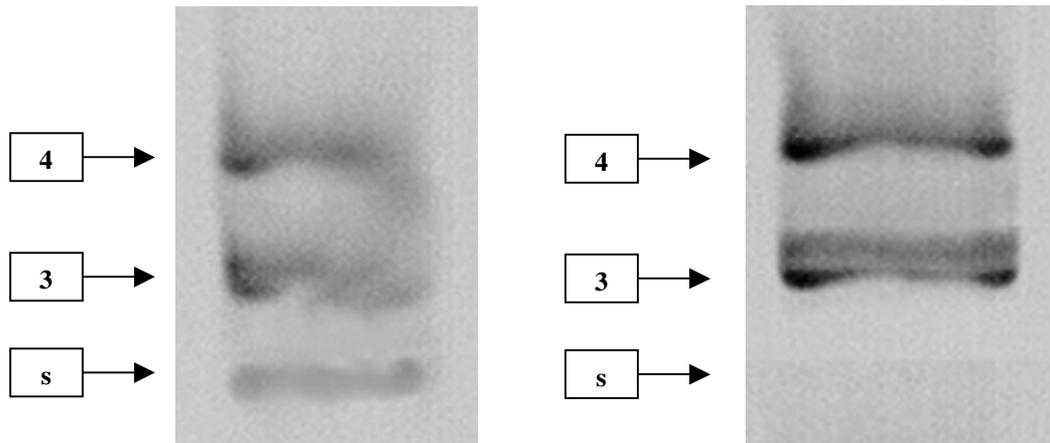


Abbildung 35 IEF von Patient 12 vor/nach Desialisierung

Tabelle 16 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
12	<sup>3</sup> / <sub>4</sub>	4	43	47
		3	43	47
		s	14	6

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

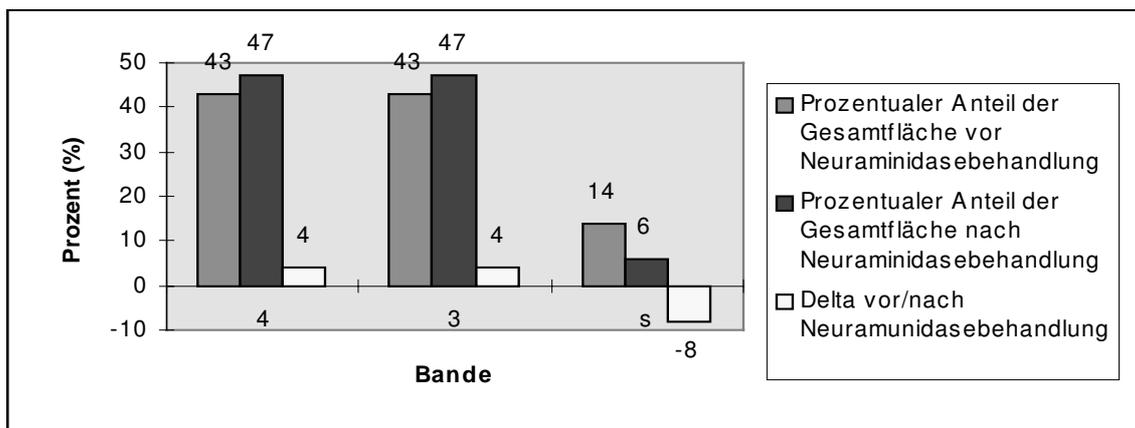


Abbildung 36

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:14%→6%) ergibt sich eine **Desialisierung um 57,13 %**.

## Patient 13

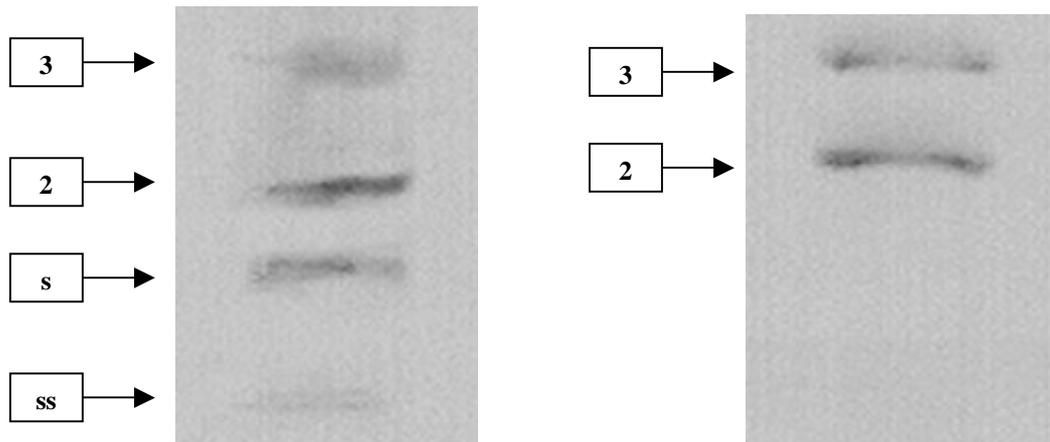


Abbildung 37 IEF von Patient 13 vor/nach Desialisierung

Tabelle 17 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
13	2/3	3	28	36
		2	37	64
		s	25	0
		ss	10	0

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

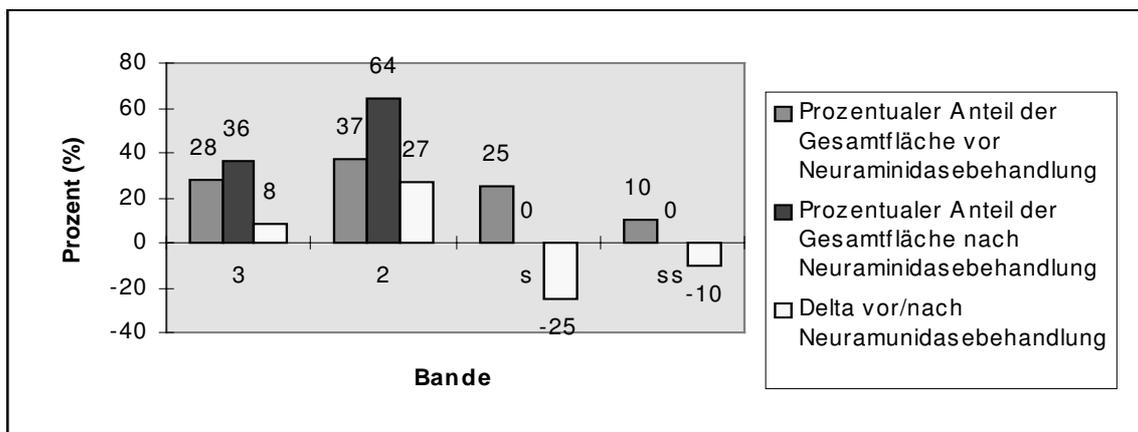


Abbildung 38

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:25%→0%, ss10%→0%, gesamt 35%→0%) ergibt sich eine **Desialisierung um 100 %**.

## Patient 14

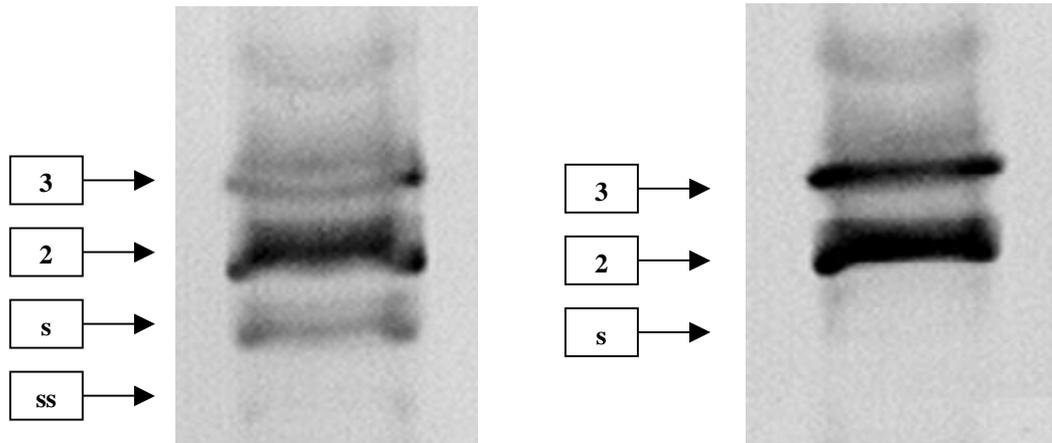


Abbildung 39 IEF von Patient 14 vor/nach Desialisierung

Tabelle 18 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
14	2/3	3	31	45
		2	46	54
		s	21	1
		ss	2	0

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

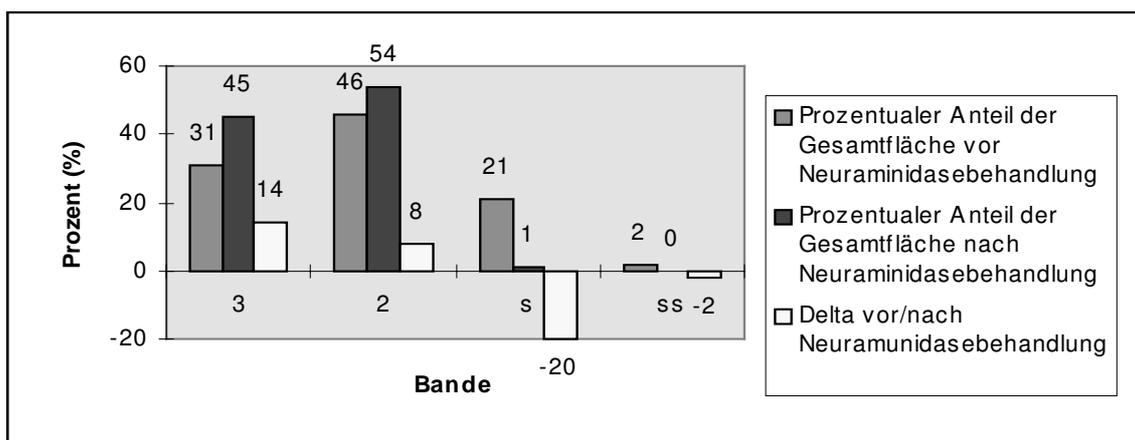


Abbildung 40

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:21%→1%, ss:2%→0%, gesamt23%→1%) ergibt sich eine **Desialisierung um 95,64%**. Da das Plasma 1:1 mit isotoner NaCl verdünnt war, beträgt die tatsächliche Reduktion der sialisierten Extrabanden nur 50% des errechneten Wertes (**47,82 %**)

## Patient 15

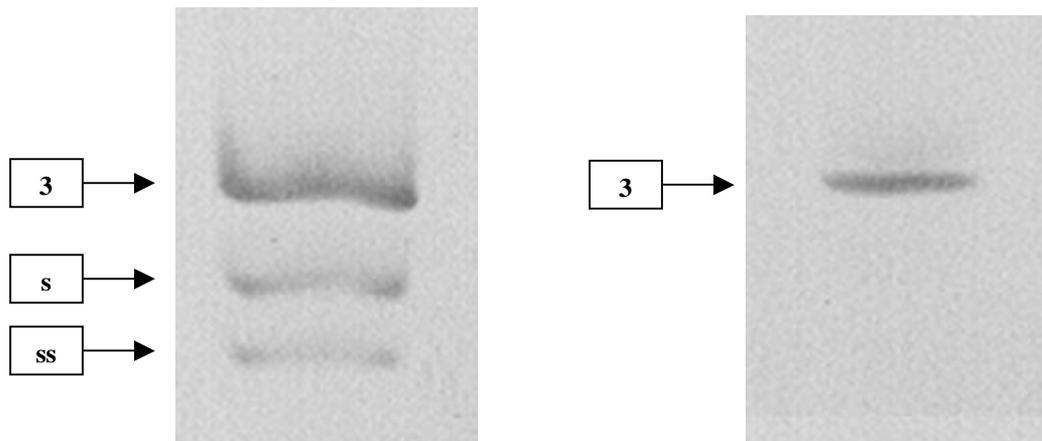


Abbildung 41 IEF von Patient 15 vor/nach Desialisierung

Tabelle 19 Densitometrische Quantifizierung vor/nach Desialisierung

Pat	GT	Bande	Volumen OD x mm <sup>2</sup> vor der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche	Volumen OD x mm <sup>2</sup> nach der Neuraminidasebehandlung in Prozent der Gesamtfläche
15	3/3	3	59	100
		s	27	0
		ss	14	0

Pat.: Patient, GT: Genotyp, Bande : Bandenposition innerhalb der Isoelektrischen Focussierung von Apolipoprotein E, OD: Optische Dichte

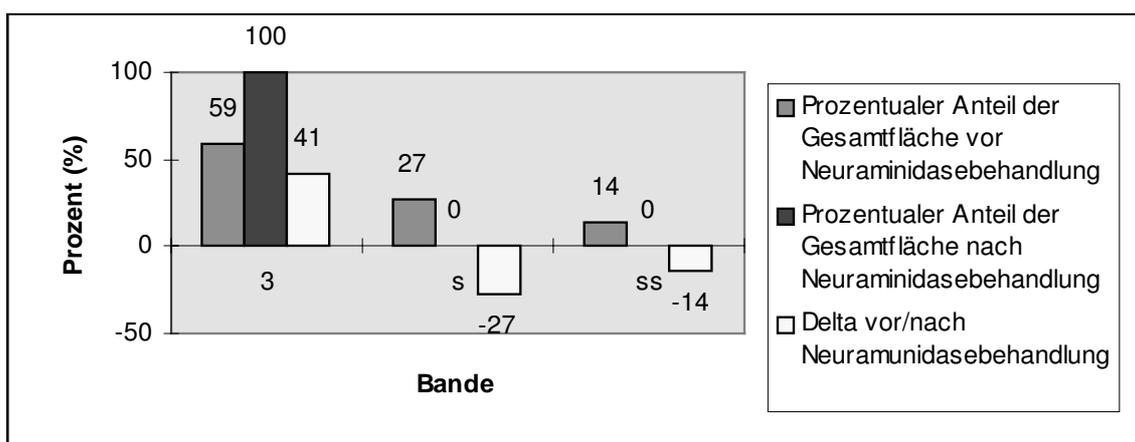


Abbildung 42

Bezogen auf die sialisierten Extrabanden (s:27%→0%, ss14%→0%, gesamt 41%→0%) ergibt sich eine **Desialisierung um 100 %**.

## 5.2 Beschreibung von Zusammenhängen und Korrelationen

Da nur solche Patienten ausgewählt wurden, die im Rahmen einer routinemäßigen Apolipoprotein E-Phänotypisierung durch mehr oder minder stark ausgeprägte Zusatzbanden auffielen (n=15), lassen sich schon bei der ersten Sichtung dieses Kollektivs einige Besonderheiten beobachten.

### 5.2.1 Geschlechtszugehörigkeit

Es überwiegt der **Anteil an männlichen Patienten** deutlich. Nur drei der fünfzehn aufgefallenen Patienten, also lediglich 20 Prozent, sind weiblichen Geschlechts.

### 5.2.2 BMI

Der ebenfalls routinemäßig festgestellte **BMI** (Body-Mass-Index =  $\text{kg Körpergewicht}/(\text{Körpergröße in cm})^2$ ) scheint in keinem Zusammenhang mit dem Anteil an sialisiertem Apolipoprotein E zu stehen (Anhang Tabelle 20).

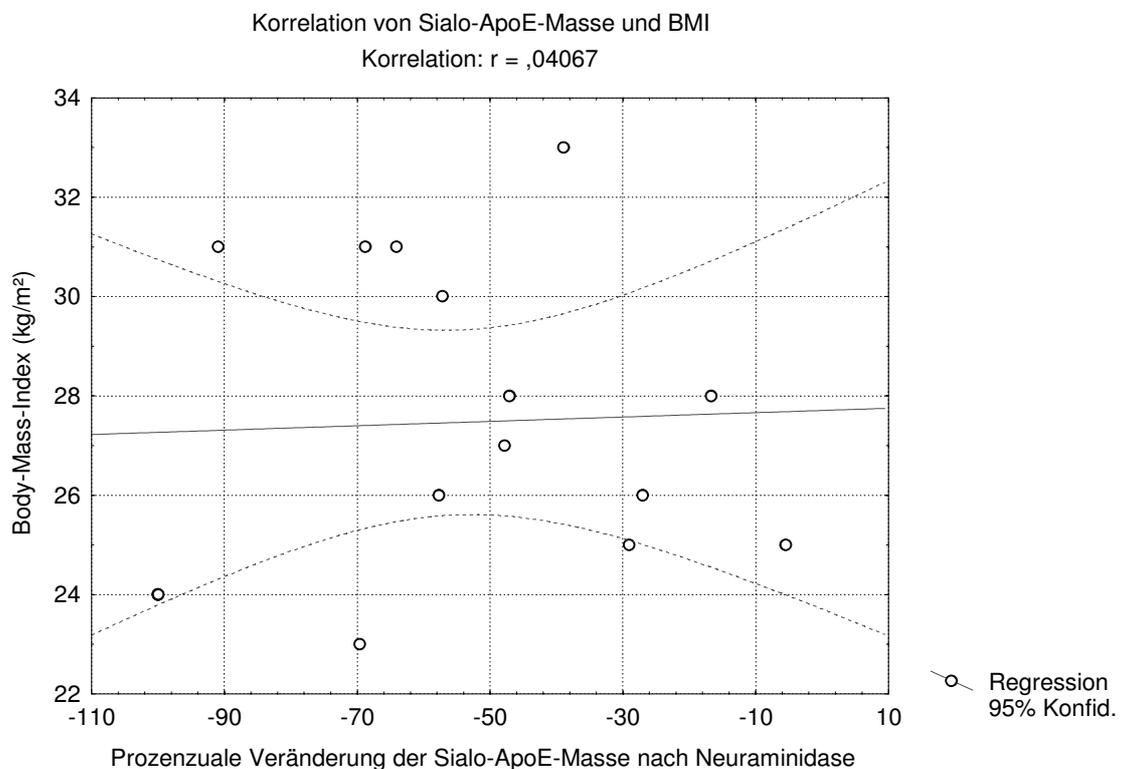


Abbildung 43

### 5.2.3 Apolipoprotein E-Genotypen

Auffällig erscheint die Tatsache, daß die Patienten mit den höchsten Sialisierungsgraden ausschließlich dem **Apo E-Genotyp E2/2** zuzuordnen sind. Die bei Patienten mit Apolipoprotein E-Genotyp E 2/2 und dem Vollbild einer Dysbetalipoproteinämie (Typ III-Hyperlipoproteinämie) auftretenden Abnormalitäten innerhalb der **Dichtegradienten** sind ebenfalls der Gruppe der höchsten ApoE-Sialisierungen zuzuordnen (Anhang Tabelle 21).

Der Apolipoprotein E-Genotyp scheint auch die **Anzahl der Sialisierungen** (einfach oder doppelt) zu beeinflussen (Anhang Tabelle 22).

Tendentiell erscheinen die homozygoten Apo E-Phänotypen (2/2, 3/3) überwiegend einfach ( 86% einfach, 14% doppelt), die heterozygoten (1/2, 2/3, 3/4) überwiegend zweifach ( 37% einfach, 63% doppelt) sialisiert vorzuliegen.

### 5.2.4 Cholesterin

Eine deutliche Korrelation ist zwischen dem Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E und der Gesamtcholesterinkonzentration, sowie der Cholesterinverteilung innerhalb der verschiedenen Lipoproteinklassen im Plasma der Patienten zu beobachten (Anhang Tabelle 23).

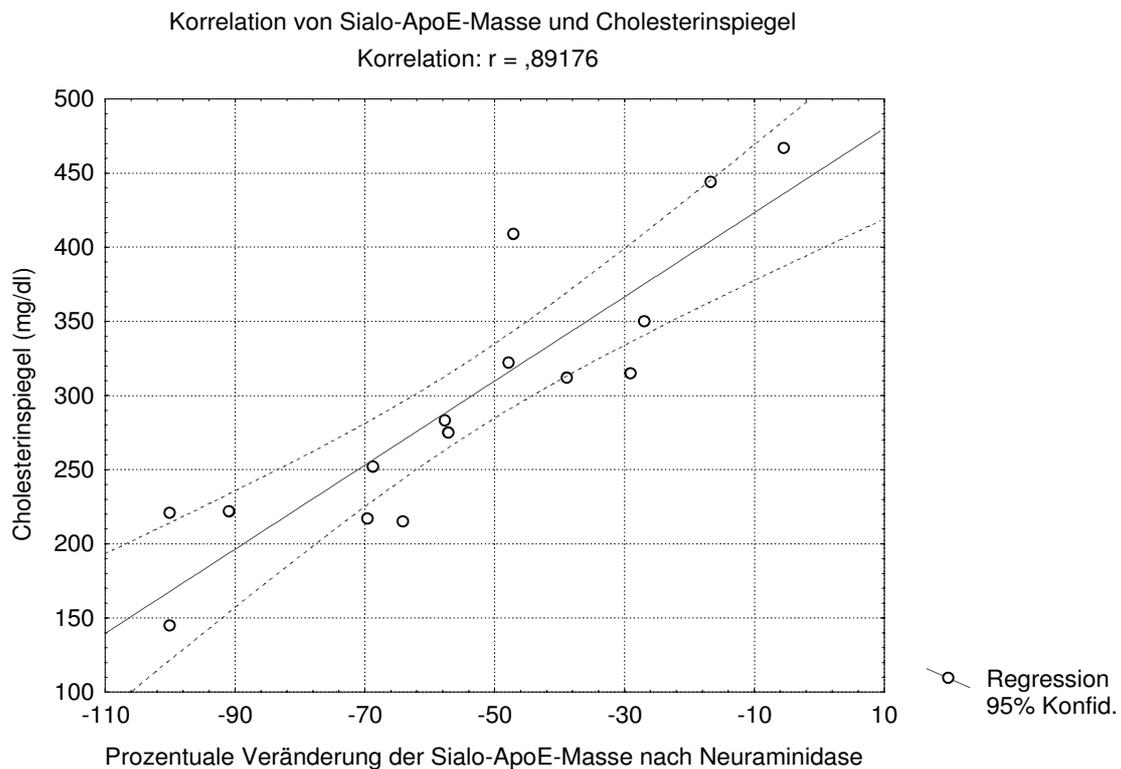


Abbildung 44

### 5.2.4.1 HDL-, LDL und VLDL-Cholesterin

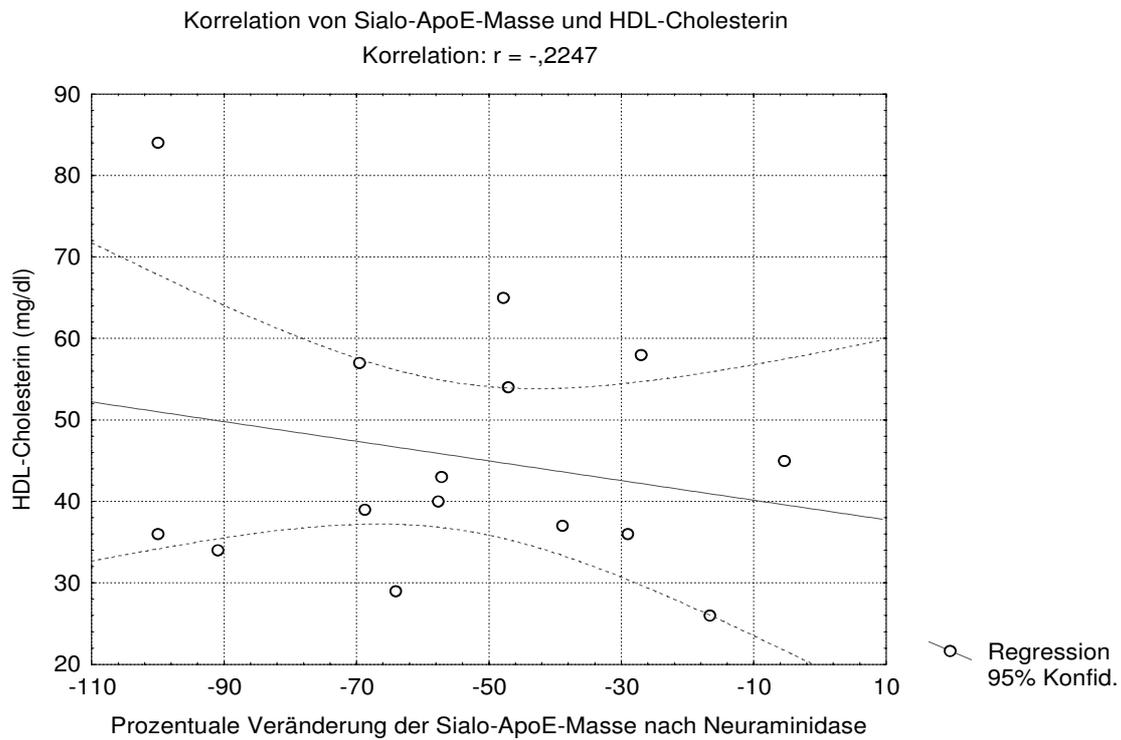


Abbildung 45

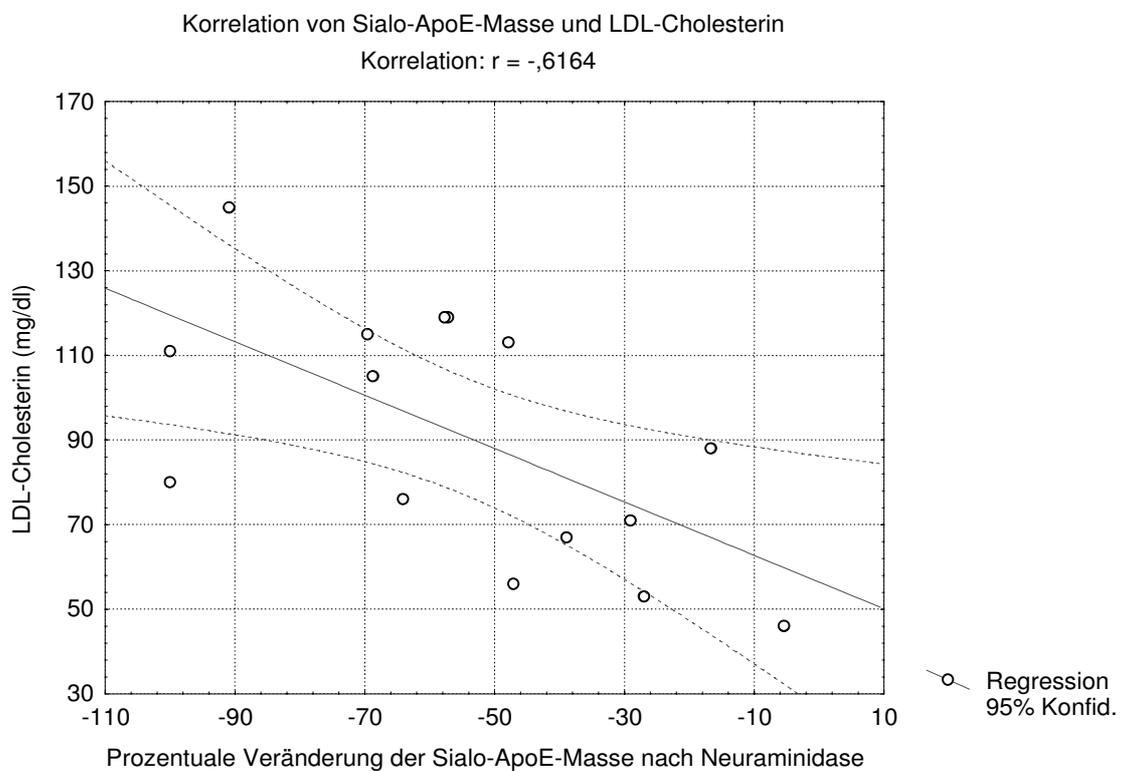


Abbildung 46

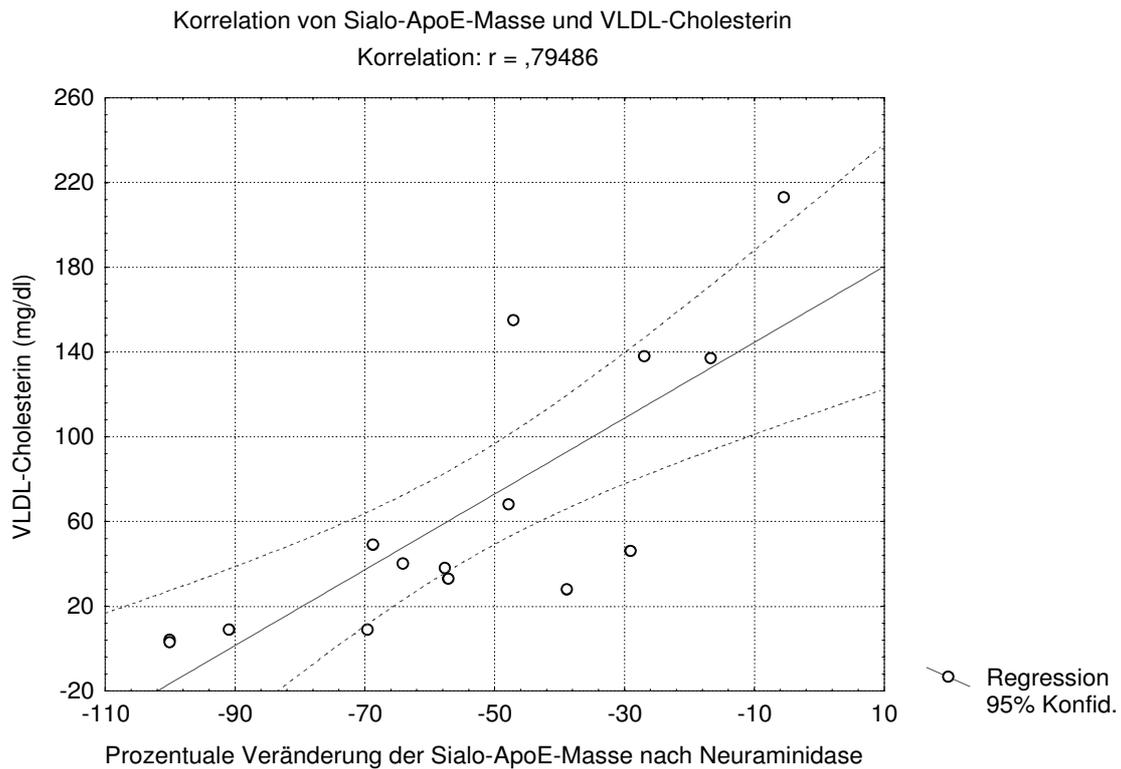


Abbildung 47

Im Gegensatz zu den geringgradig negativen Korrelationen von Sialo-Apo E mit HDL- und LDL-Cholesterin, besteht bezüglich des VLDL-Cholesterin wieder eine deutlich positive Korrelation.

### **5.2.5 Triglyzeride**

Auch für den Plasmatriglyzeridspiegel läßt sich eine deutlich positive Korrelation mit der Masse an sialisiertem Apolipoprotein E erkennen (Anhang Tabelle 24). Im Zusammenhang mit der ebenfalls positiven Korrelation zum VLDL-Cholesterin verdeutlicht sich hier nun die Bedeutung "Triglyzeridreicher Lipoproteine" für den Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E.

Korrelation von Sialo-ApoE-Masse und Triglyzeridspiegel

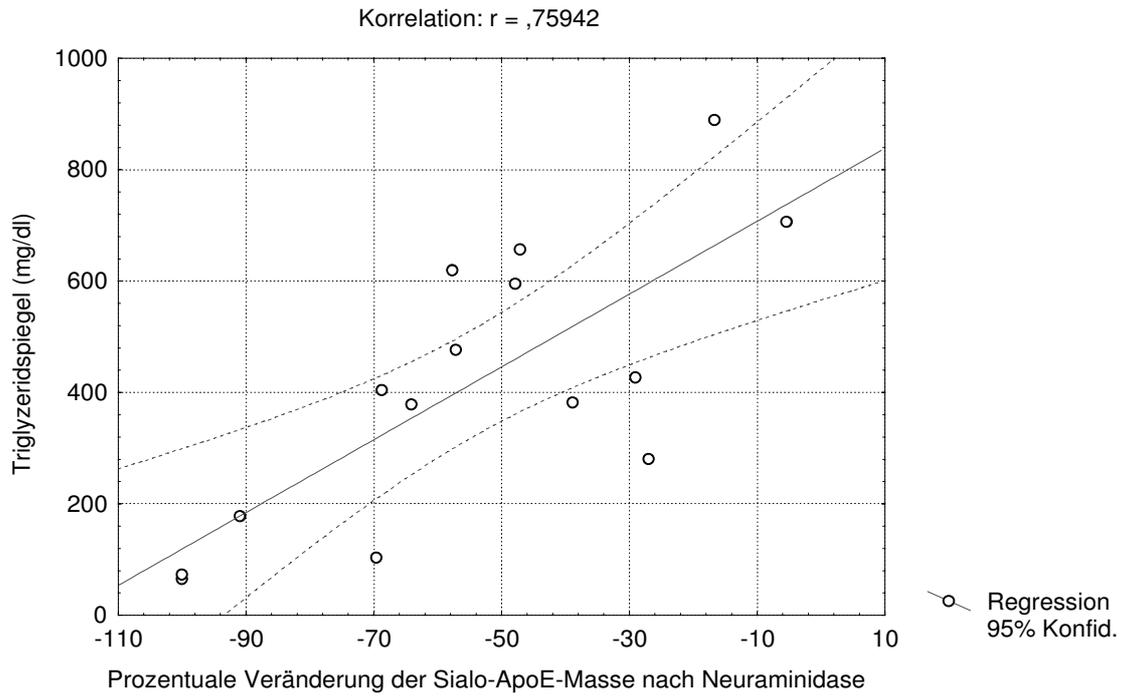


Abbildung 48

## 5.2.6 Glukose

Korrelation von Sialo-ApoE-Masse und dem Plasmaglukosespiegel (nüchtern)

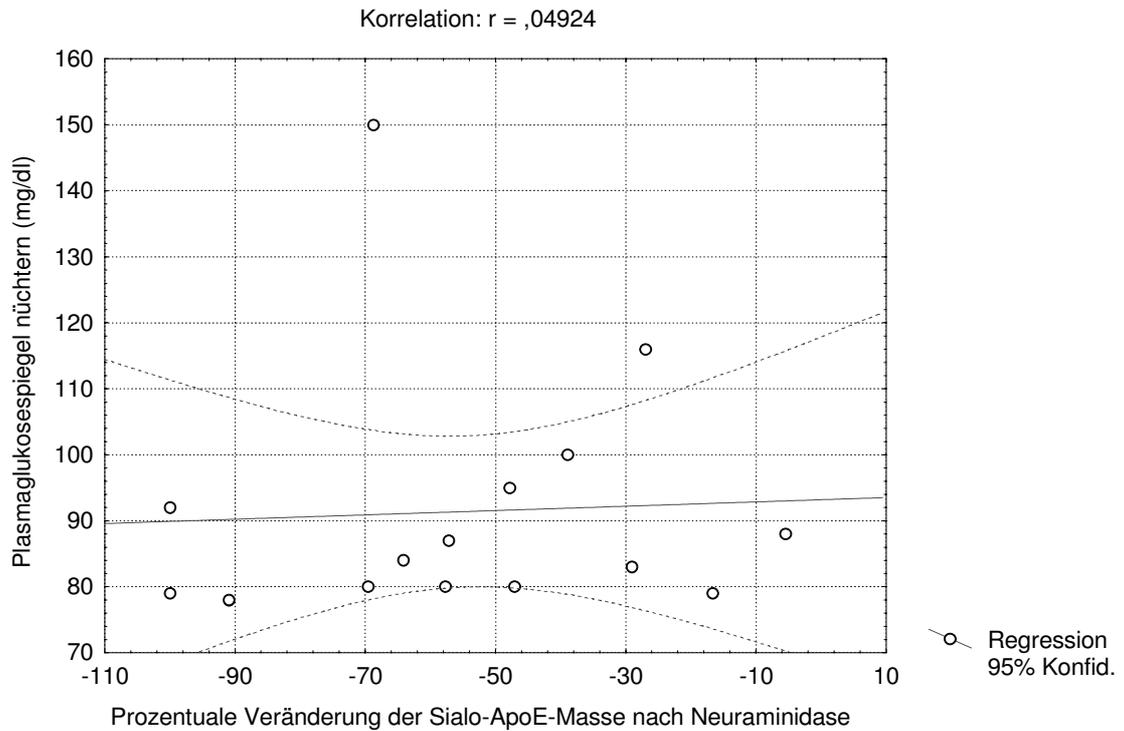


Abbildung 49

Es existiert keine signifikante Korrelation von Sialo Apo E-Masse mit dem Plasmaglukosespiegel (Anhang Tabelle 25). Die bei Diabetikern beschriebene signifikante Erhöhung vom Apo E-Sialisierungsgrad gegenüber einer nichtdiabetischen Kontrollgruppe [5] scheint eher durch die beim Diabetiker häufig erhöhten Triglyzeridspiegel, als durch eine Erhöhung der Plasmaglukosewerte bedingt zu sein.

### 5.2.7 Apolipoprotein E-Masse

Eine weitere wichtige Beobachtung ist die signifikante Korrelation von Apolipoprotein E-Gesamtmasse und der Masse an sialisiertem Apolipoprotein E (Anhang Tabelle 26).

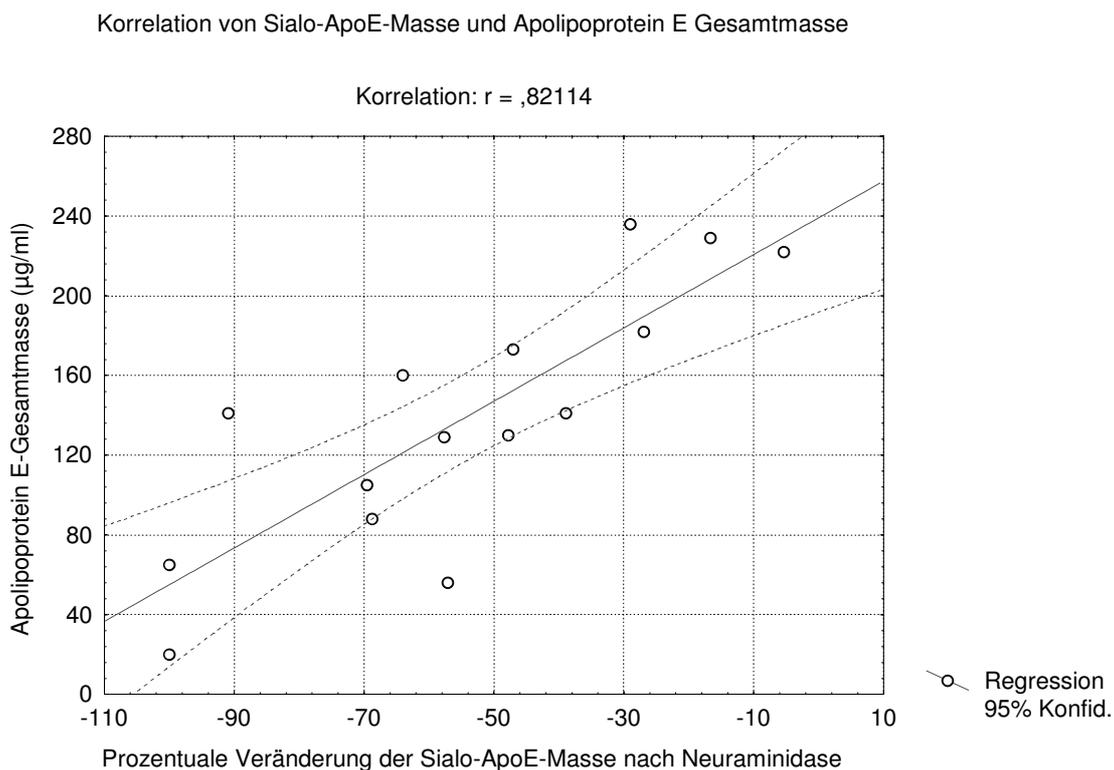


Abbildung 50

Diese deutlich positive Korrelation kann noch spezifiziert werden durch Korrelationen der Sialo-Apo E-Masse mit der Apolipoprotein E-Masse innerhalb der einzelnen Lipoproteinfraktionen (Anhang Tabelle 26+27).

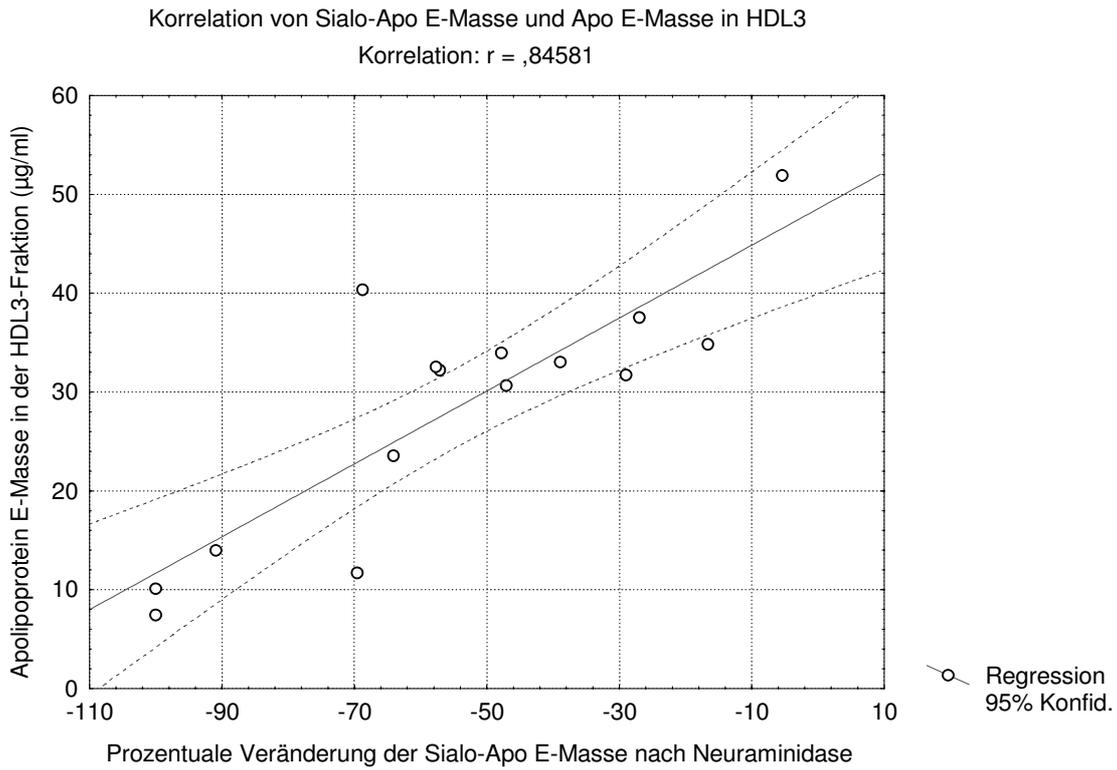


Abbildung 51

Auch hier besteht eine signifikant positive Korrelation. Bezüglich der weiteren Fraktionen läßt sich eine solche Beobachtung nicht machen.

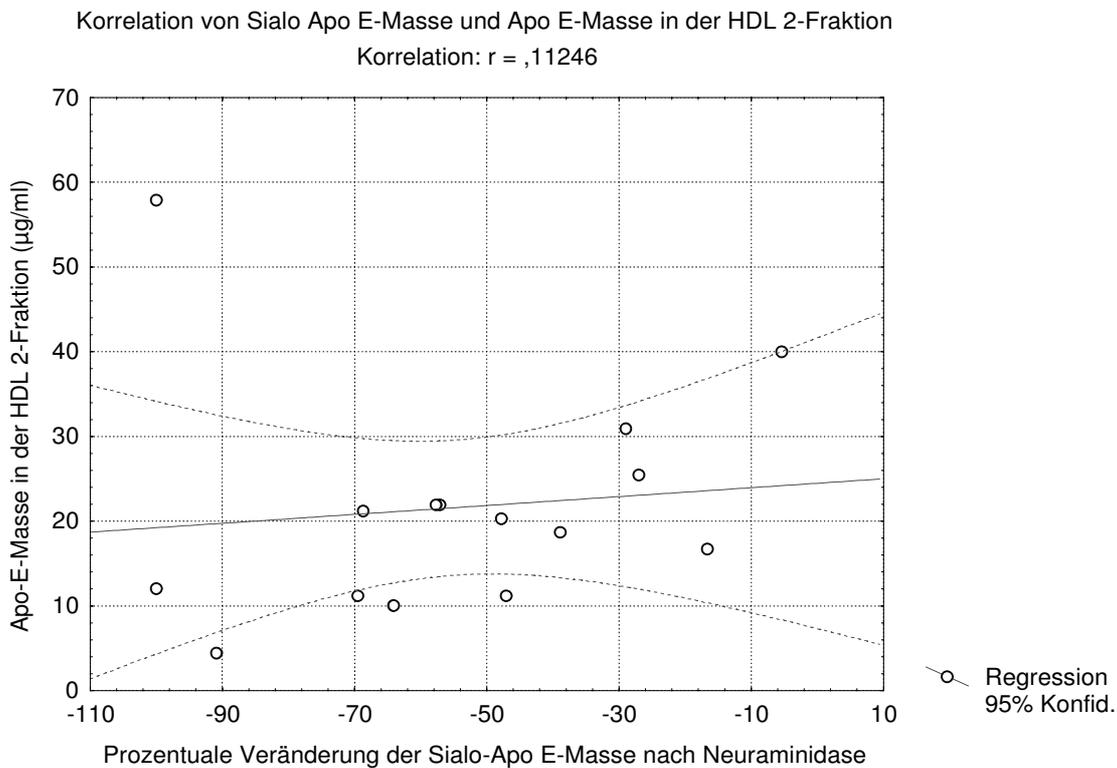


Abbildung 52

Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und Apo E-Masse in der VLDL-Fraktion

Korrelation:  $r = ,18726$

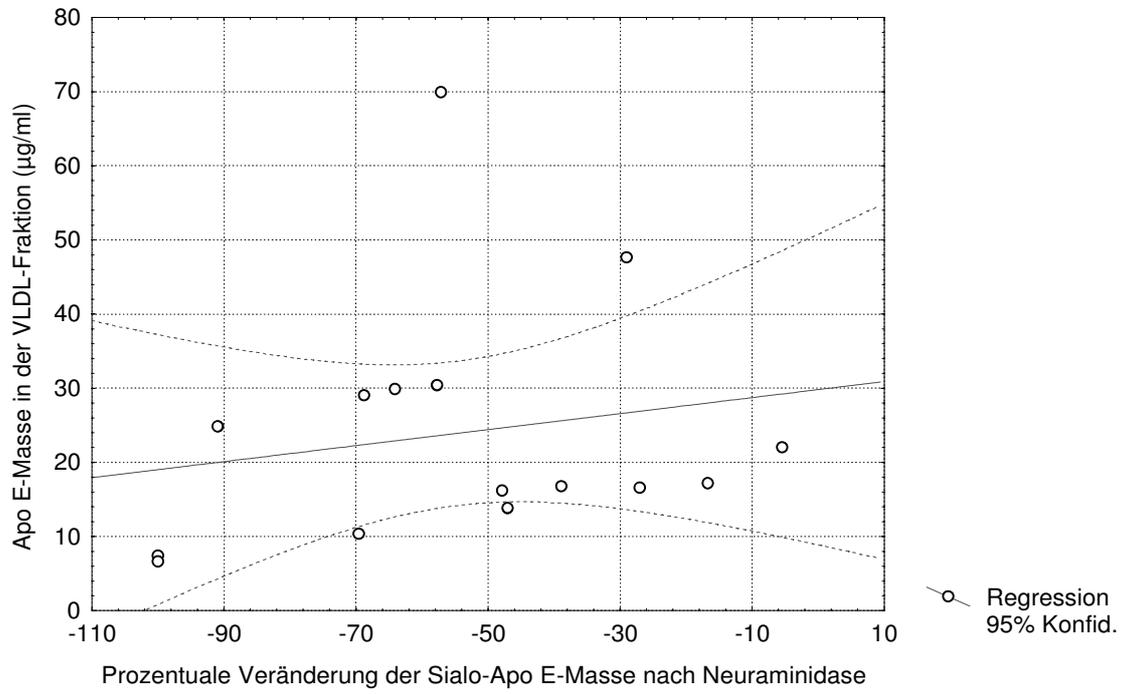


Abbildung 53

## 5.2.8 Lipoproteinlipase / Hepatische Lipase

Auch bezüglich der **Lipoproteinlipaseaktivität** kann trotz der geringeren Aussagekraft wegen der kleinen Fallzahl (n=8, für 7 weitere Patienten war dieser Wert nicht verfügbar) eine zumindest tendentiell negative Korrelation mit der Masse an sialisiertem Apolipoprotein E gezeigt werden (Anhang Tabelle 28).

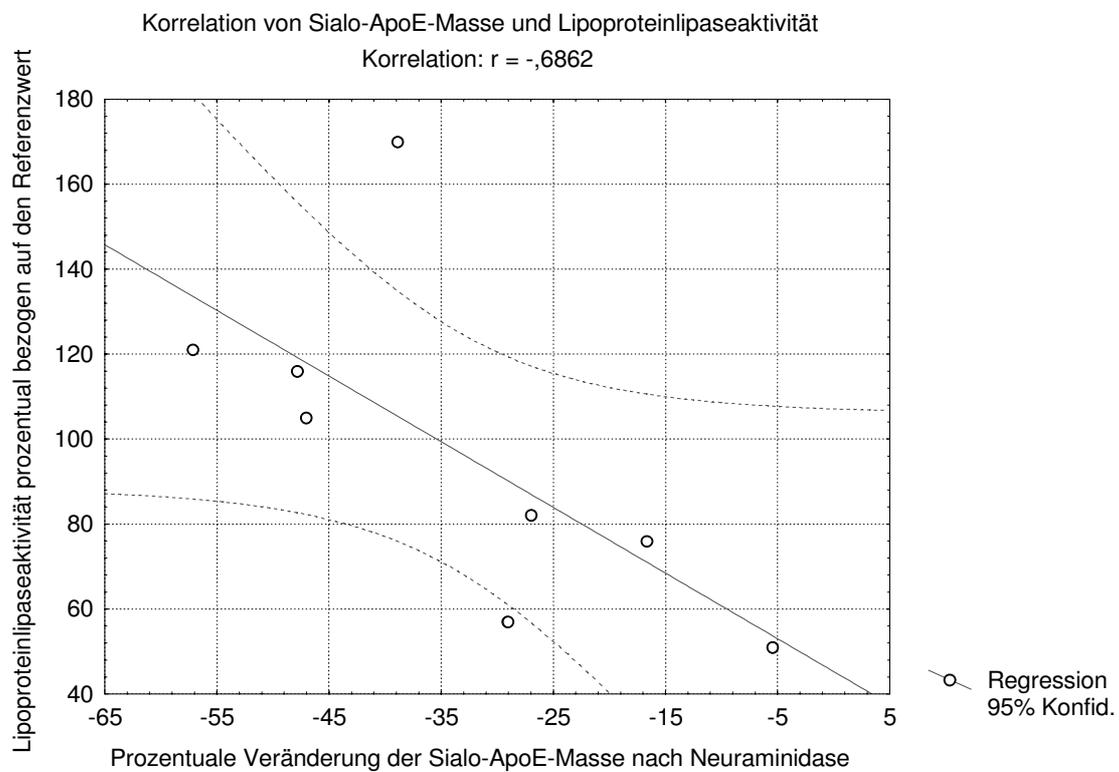


Abbildung 54

Für die Aktivität der **Hepatischen Lipase** läßt sich eine solche Korrelation nicht erkennen.

Korrelation von Sialo-ApoE-Masse und Aktivität der Hepatischen Lipase

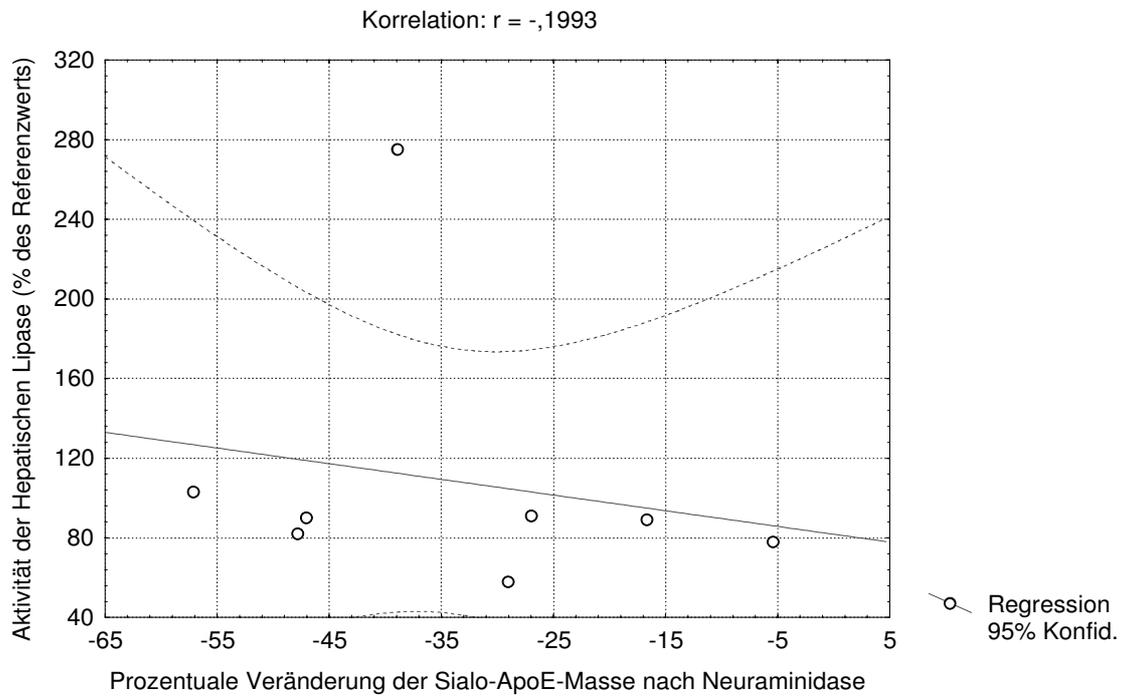


Abbildung 55

## 6. Diskussion:

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen artherogenen Fettstoffwechselfparametern und der Masse an sialisiertem Apolipoprotein E im Plasma festgestellt und quantifiziert werden.

Für den zu beobachtenden erhöhten Anteil männlicher Patienten mit verstärktem Apo E-Sialisierungsgrad läßt sich in der Literatur kein Beleg finden. Allerdings wird ein generell höherer Serumsialinsäurespiegel bei Frauen als bei Männern beschrieben [70, 76]. Da ein Bezug zwischen dem Serumsialinsäurespiegel und dem Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E nicht bekannt ist, läßt diese Information jedoch keinen wirklichen Rückschluß zu. Andere Arbeiten weisen auf eine signifikante Korrelation vom Gesamtserumsialinsäurespiegel mit dem systolischen Blutdruck, dem Serumcholesterin- und Triglyzeridspiegel, sowie dem BMI bei Frauen hin [69]. Bei Männern konnte eine Korrelation nur für den Cholesterin- und Triglyzeridspiegel gezeigt werden [69], was geschlechtsspezifische Unterschiede nahelegt. Weiterhin scheint es geschlechtsspezifische Effekte des Apolipoprotein E-Genotyps auf verschiedene Fettstoffwechselfparameter zu geben. So wurde bei Frauen mit dem Apo E-2/2-Genotyp eine deutliche Erhöhung von HDL-Cholesterin und LpA1-Spiegeln beobachtet, während dies bei den männlichen Probanden nicht der Fall war [76].

Die Bedeutung des Body-Mass-Index zur Erstellung eines Risikoprofils für die Entwicklung einer Arteriosklerose oder metabolischen Stoffwechselstörung wie Diabetes mellitus Typ II sind bekannt und ausreichend beschrieben. Es wurden Korrelationen des BMI mit dem arteriellen Blutdruck, dem Glukosespiegel, der Harnsäure, dem Triglyzeridspiegel, dem HDL-Cholesterin und dem artherogenen Index in allen Altersgruppen nachgewiesen [69, 77, 78].

Auch besteht eine signifikante Korrelation von BMI und dem Serumsialinsäurespiegel [69], der, wie schon erwähnt, keinen Rückschluß auf den Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E zuläßt. In dieser Arbeit konnte keine signifikante Korrelation vom Apo-E-Sialisierungsgrad und dem BMI festgestellt werden.

Auffällig war, daß die höchsten Sialo-Apo E-Massen ausschließlich bei Probanden des Apolipoprotein E-Genotyps 2/2 mit ausgeprägter Dysbetalipoproteinämie und entsprechend erhöhten Triglyzerid- und Cholesterinspiegeln gefunden wurden. Diese genetische Prädisposition führt über ein reduziertes Apo E-Bindungsverhalten am B/E-Rezeptor zu einer verlängerten Zirkulationszeit Apo E angereicherter *Remnant*-Lipoproteine, was eine deutlich erhöhte Apolipoprotein E-Gesamtmasse zur Folge hat. Auch sind erhöhte Triglyzeride bekanntlich mit einer erhöhten Apolipoprotein E-Masse [59] und einem hohen Sialisierungsgrad [14] von Apo E assoziiert. Dieselbe Korrelation konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden. Eine Erklärung kann die bei HTG erhöhte Fraktion von *Intermediate-Sized Remnant-Like Lipoproteins* sein, welche einen signifikanten Anteil des Plasma-Apolipoprotein E enthalten [60]. *Shuvaev et al.*[79] beschreiben eine isoformspezifische Glykierung von Apolipoprotein E und erstellen folgende Rangfolge: Apo E (2) > Apo E (4) > Apo E (3). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen in die gleiche Richtung. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die Auslastung der katalytischen Kapazität der Lipoproteinlipase bei erhöhten Triglyzeridspiegeln.

Die weiteren Apolipoprotein E-Genotypen der auffällig gewordenen Probanden waren bis auf zwei Fälle mit E3/3 heterozygot (1/2, 2/3, 3/4), der Apo E-Genotyp 4/4 kam nicht vor. Wie zu erwarten wiesen die heterozygoten Formen vornehmlich eine zweifache, die homozygoten eine einfache Sialisierung auf. Apolipoprotein E stellt sich im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich in seiner Asialo-, Monosialo- und Disialoform im Plasma dar, ein Ergebnis, welches frühere Beobachtungen, z.B. von *Wernette-Hammond et al.* [12], bestätigt.

Die signifikant positive Korrelation vom Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E mit dem Gesamtcholesterinspiegel ( $r = +.89$ ) bei negativer Korrelation zum LDL ( $r = -.62$ ) - und HDL-Cholesterin ( $r = -.21$ ) und positiver Korrelation mit dem VLDL-Cholesterin ( $r = +.78$ ) spiegelt deutlich die typischen Veränderungen des Lipoproteinprofils von Patienten mit einer Dysbetalipoproteinämie wieder. Da Patienten mit einer ausgeprägten Dysbetalipoproteinämie ein deutlich erhöhtes Arterioskleroserisiko gegenüber Gesunden aufweisen, könnte das Auftreten

von verstärkt sialisiertem Apolipoprotein E ein Zeichen für einen proatherogenen Zustand sein. Eine genauere Besprechung der erniedrigten HDL-Spiegel erfolgt weiter unten.

Der Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E korrelierte in diesem Patientenkollektiv signifikant ( $r = +.76$ ) mit dem Triglyzeridspiegel im Serum. Eine signifikant erhöhte Apo E3s/Apo E3-ratio bei Patienten mit einer Hypertriglyzeridämie wurde schon von *Ito et al.* [14] beschrieben. Auch für die Serumsialinsäuregesamtmasse besteht eine positive Korrelation mit dem Triglyzeridspiegel [69]. Eine Hypertriglyzeridämie scheint sich offensichtlich negativ auf den Abbau bzw. die Abspaltung von Sialinsäuran auszuwirken oder die Freisetzung von höher sialisiertem Apolipoprotein E zu begünstigen. Da dies nicht für sialisiertes LDL, für welches eine negative Korrelation von Sialisierungsgrad und Triglyzeridspiegel besteht [80], zutrifft, müssen unterschiedliche Wege der Sialisierung/Desialisierung für die verschiedenen Lipoproteinklassen in Betracht gezogen werden.

Zum Zusammenhang zwischen dem Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E und dem Zuckerstoffwechsel existieren teilweise widersprüchliche Aussagen. Während *Kopitzsch et al.*[5] einen signifikant erhöhten Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E beim insulinabhängigen (IDDM), wie auch beim insulinunabhängigen (NIDDM) Diabetes mellitus beobachtete, beschreiben andere Autoren eine positive Korrelation lediglich beim NIDDM, nicht jedoch bei einem gut eingestellten IDDM [66, 67]. Auch scheint eine Insulindefizienz den Sialisierungsgrad stärker zu beeinflussen als eine Hyperglykämie [66], was sich auch in der signifikanten Korrelation der täglich benötigten Insulindosis mit dem Sialinsäurespiegel niederschlägt [67]. Da Insulin eine Aktivierung der Lipoproteinlipase bewirkt, könnte ein Insulinmangel über eine verringerte LPL-Aktivität den Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E modifizieren. In dieser Arbeit konnte keine signifikante Korrelation zwischen Apo E-Sialisierungsgrad und Plasmaglukosespiegel (nüchtern) festgestellt werden, wohl aber zur LPL-Aktivität.

Die sich in dieser Arbeit zeigende signifikante Korrelation vom Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E mit der Apolipoprotein E-Gesamtmasse im Plasma kann verschiedene Gründe haben. Da etwa 25 % des Apolipoprotein E im Plasma sialisiert vorliegen [6], diese aber in der IEF des Patienten mit einer "normalen" E-Masse in der Regel nicht sichtbar sind und erst bei erhöhten E-Massen in Erscheinung treten, könnte gefolgert werden, daß das Auftreten von sialisierten Extrabanden nicht mit einem erhöhten Sialisierungsgrad in Verbindung gebracht werden muß, sondern ein massenabhängiges Phänomen darstellt. Da sich die Extrabanden innerhalb der IEF jedoch auch bei Patienten mit Apo E-Normwerten nachweisen lassen, reicht diese Erklärung nicht aus.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht in der Kapazitätsauslastung des die N-acetylneuraminsäurereste abspaltenden Enzymsystems beim Anfall einer zu großen Substratmenge, was den Sialisierungsgrad ansteigen lassen würde. Wichtig hierbei ist auch die enge Verknüpfung des Auftretens hoher Apolipoprotein E-Massen mit der Akkumulation Apo-E-enthaltender Lipoproteine bei bestimmten Fettstoffwechselstörungen wie der Dysbetalipoproteinämie. Auch die hierbei erhöhten Spiegel anderer Stoffwechselfparameter könnten die Abspaltung von Sialinsäureresten verhindern.

Ein besonders interessanter Aspekt ergab sich aus den Korrelationen des Apo E-Sialisierungsgrads mit den Apolipoprotein E-Massen innerhalb der verschiedenen Apo E-enthaltenden Lipoproteinklassen. Hier fiel eine deutliche Korrelation des Sialisierungsgrades von Apo E mit der Apolipoprotein E-Masse innerhalb der HDL(3)-Fraktion auf, während sich dies nicht für die HDL(2)-Fraktion zeigte. *Marmillot et al* [65] wiesen eine 11.2-fach erhöhte Affinität von sialisiertem Apo E für HDL im Vergleich zu nicht sialisiertem Apo E in vitro nach. Auch wurde eine erhöhte Aufnahme von sialisiertem Apo E (153%) enthaltenden HDL-Partikeln in HepG2-Zellen bei vergleichsweise niedrigeren Aufnahmeraten von HDL, welches desialisiertes Apo E enthielt, beobachtet [65]. All diese Beobachtungen lassen sich inhaltlich in Einklang bringen. Es scheint, als würde die Sialisierung von Apo E dessen Affinität für HDL-, speziell für HDL(3) steigern. Ursächlich hierfür könnte die von *Weisgraber et al.* [63] im Rahmen des genetischen Apo E-Polymorphismus beobachtete, genotypspezifische Lipoproteinpräferenz durch veränderte Interaktion zwischen amino- und carboxyterminaler Domäne sein. Eine Apo E-Sialisierung könnte ebenso die

Apo E-Lipoproteinpräferenz durch eine veränderte Domäneninteraktion beeinflussen. Die dadurch bedingte Apo E-Anreicherung in der HDL-Fraktion würde demgemäß die Interaktionsfähigkeit mit dem B/E-Rezeptor verstärken und die Aufnahme von HDL(3)-Partikeln vergrößern, was sich modifizierend auf den *reverse cholesterol transport* auswirken könnte. Eine beschleunigte *Clearance* von kleinen HDL(3)-Partikeln aus der Zirkulation und ein konsekutives Absinken des HDL-Spiegels wurde schon von *Johansson et al.* [25], wie auch *Brinton et al.* [82] beschrieben. Auch in dieser Arbeit konnte ein inverses Verhältnis zwischen dem Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E und der HDL-Gesamtmasse festgestellt werden.

Es wurde beobachtet, daß Alkohol die mRNA von Sialyltransferasen destabilisiert und somit die Sialisierung von Apo E reduziert [81, 83]. Auch besteht bei chronischem Alkoholkonsum eine direkte positive Korrelation zwischen täglich aufgenommener Alkoholmenge und dem HDL(3)-Spiegel [84]. Dieses Beispiel verdeutlicht das besondere Zusammenspiel von Apo E-Sialisierungsgrad und der HDL(3)-Konzentration im Serum.

Es deutet sich an, daß ein verstärkter Apo E-Sialisierungsgrad zu einem Absinken des HDL-Spiegels, insbesondere des HDL(3)-Spiegels führen kann. Einen zusätzlich den HDL-Spiegel senkenden Effekt hat der ebenfalls deutlich mit dem Apo E-Sialisierungsgrad korrelierende Serumtriglyzeridspiegel [14]. Da ein erniedrigter HDL-Spiegel proatherogen wirkt [27, 28, 29, 30], könnte ein erhöhter Apo E-Sialisierungsgrad die Entstehung oder Progredienz von arteriosklerotischen Läsionen beschleunigen. Andererseits könnte die verbesserte Aufnahme von Sialo-Apo E-enthaltendem HDL den Cholesterinrücktransport aus den Gefäßen vereinfachen. Die genaue Art dieser Interaktionen bleibt jedoch unklar und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die beobachtete negative Korrelation ( $r = -.67$ ) zwischen der Lipoproteinlipase-Aktivität und dem Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E läßt sich auf zwei Wegen erklären. Zum einen bewirkt eine Aktivitätsminderung oder eine Sättigung der katalytischen Kapazität der LPL (bedingt u.a. durch einen Enzymmangel, Mangel an Apo CII, Insulindefizienz, Hypertriglyzeridämie) eine Verringerung des Abbaus triglyzeridreicher Lipoproteine, insbesondere der VLDL, welche einen hohen Anteil des Gesamt-Apo E enthalten. Eine Akkumulation dieser Lipoproteine führt also unmittelbar zu einer Erhöhung des Apolipoprotein E-Spiegels. Die Modifikation des Sialisierungsgrads von Apo E wird jedoch durch einen anderen Mechanismus erklärt. *Lucas et al.* [85] beobachteten, daß die Neusekretion von Apolipoprotein E von der Zelloberfläche von Makrophagen durch die Lipoproteinlipase über einen LDL-Rezeptor-abhängigen Mechanismus verringert wird. Da jedoch gerade neu sezerniertes Apolipoprotein E in besonders hohem Maße sialisiert vorliegt [6], erscheint die beobachtete negative Korrelation zwischen Apo E-Sialisierungsgrad und Lipoproteinlipaseaktivität plausibel.

Zum anderen wurde berichtet, daß der Apo E-Polymorphismus die Aktivität der Lipoproteinlipase über eine Änderung des Bindungsverhaltens der Lipoproteine an den LPL-Heparansulfatproteoglykan-Komplex beeinflusst [86]. So zeigte sich eine besonders beim Apo E 2/2-Genotyp verringerte Bindung an den LPL-HSPG-Komplex und eine verringerte Abbaurate. Es liegt nahe, daß auch eine Erhöhung des Sialisierungsgrades von Apo E den Apo E-vermittelten Lipoproteinabbau durch die LPL negativ beeinflussen könnte [87]. Die dadurch bedingte Erhöhung des Triglyzeridspiegels könnte wiederum zu einer Sättigung des LPL-Systems führen, was einen *circulus vitiosus* zur Folge hätte.

Auch hier sollte die Konkretisierung dieser Zusammenhänge Inhalt weiterer Untersuchungen sein (z.B.: Veränderung des Sialisierungsgrades von Apo E vor/nach Gabe von Heparin, unter Behandlung mit Fibraten etc.).

## 7. Zusammenfassung

Die Sialisierung von Lipoproteinen, speziell von Apolipoproteinen ist ein komplexes, zum Teil noch unverstandenes Kapitel innerhalb des Lipidstoffwechsels. Vielfältige Interaktionen zwischen unterschiedlichen Parametern machen die Deutung schwer.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigt sich eine Assoziation vom Apolipoprotein E-Sialisierungsgrad mit pathologischen Lipidstoffwechselfparametern. So ist der höchste Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E bei Probanden mit dem Apolipoprotein E-Genotyp  $\epsilon 2/2$  und dem Vollbild einer Dysbetalipoproteinämie zu beobachten. Weiterhin besteht eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Apo E-Sialisierungsgrad und dem Gesamtcholesterin- und Gesamttriglyzeridspiegel, sowie eine negative Korrelation mit dem HDL-Cholesterinspiegel.

Die mit dem erhöhten Apo E-Sialisierungsgrad assoziierte Apolipoprotein E-Gesamtmasse verteilt sich erwartungsgemäß größtenteils auf die HDL-Fraktion und die triglyzeridreichen Lipoproteine (5.2.7). Innerhalb der HDL-Fraktion fällt eine signifikant positive Korrelation des Apo E-Sialisierungsgrades mit der Apo E-Masse in der HDL(3)-Subfraktion auf, was für eine durch den Sialisierungsgrad beeinflusste Lipoproteinpräferenz von Apolipoprotein E spricht.

Für die Aktivität der Lipoproteinlipase konnte eine Korrelation mit dem Sialisierungsgrad von Apo E festgestellt werden, was auf einen noch unzureichend bekannten Einfluß der LPL auf den Sialisierungsgrad von Apo E hindeutet.

Eine Assoziation des Apolipoprotein E-Sialisierungsgrades mit dem Nüchternglukosespiegel im Serum konnte nicht beobachtet werden.

Insgesamt zeigt sich ein komplexes Interaktionsmuster, wobei eine Hyperlipoproteinämie und eine Aktivitätsminderung der Lipoproteinlipase zu einer verstärkten Apolipoprotein E-Sialisierung zu führen scheinen. Diese erhöht die Affinität von Apolipoprotein E zu der HDL-(3)-Subfraktion und beeinflusst wiederum deren Metabolismus.

Letztlich ist ein erhöhter Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E mit einem proatherogenen Zustand assoziiert. In wie weit er jedoch kausal für diesen oder aber dessen Folge ist, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

## 8. Anhang

### 8.1. Literaturverzeichnis

1. P. Alaupovic, D.M. Lee, V.J. McConathy: Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochem. Biophys. Acta* 260 (1972): 689-707.
2. Karl Weisgraber: Form and Function in Apolipoprotein E:  
<http://gladstone.ucsf.edu/pubs/Focus/FocusS97/weisgraber.html>
3. Vassilis I. Zannis, Jan L. Breslow, et al.: Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *Journal of Lipid Research*. Volume 21, 1982.
4. Philip R. Wenham, Alyaa Sedky and Richard J. Spooner: Apolipoprotein E phenotyping: a word of caution. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 599-605.
5. S. Kopitzsch, L. Winkler, B. Oswald, B. Schlag und R. Dargel: Der Sialisierungsgrad von Apolipoprotein E bei insulinabhängigem (IDDM) und nicht insulinabhängigem (NIDDM) Diabetes mellitus. *Z. med. Lab.diagn.* 31 (1990), Heft 1.
6. Vassilis I. Zannis, Joseph McPherson, Gabriel Goldberger, Sotirios K. Karathanasis, and Jan L. Breslow: Synthesis, Intracellular Processing, and Signal Peptide of Human Apolipoprotein E. *The Journal of Biological Chemistry*, 1984 by The American Society of Biological Chemists, Inc., Vol. 259, No. 8, Issue of April 25, pp. 5495-5499, 1984.
7. S.C. Rall, K.H. Weisgraber, T.L. Innerarity, and R.W. Mahley: The Carbohydrate Moiety of Human Plasma Apolipoprotein E. *Abstracts of the 58th Scientific Sessions*, 1985, III-143, 572.
8. V.I. Zannis, J. van der Spek, D. Silverman: Intracellular modifications of human apolipoprotein E. *J Biol Chem*, 1986 Oct. 15; 261 (29): 13415-21.
9. Giancarlo Ghiselli, Yitzhak Beigel, Maurizio Soma, and Antonio M. Gotto, Jr.: Plasma Catabolism of human apolipoprotein E Isoproteins: Lack of Conversion of the Doubly Sialylated Form to the Asialo Form in Plasma. *Metabolism*, Vol. 35, No. 5 (May), 1986: pp 399-403.
10. A. Visser, P. Emmelot: Studies on plasma membranes. XX. Sialidase in hepatic plasma membranes. *J Membr Biol* 14:73-84, 1973.
11. H.B. Bosmann: Platelet adhesiveness and aggregation. II. Surface sialic acid, glycoprotein: N-acetylneuraminic acid transferase, and neuraminidase of human blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 279:456-474, 1972.

12. Mary Ellen Wernette-Hammond, Stephen J. Lauer, Alberto Corsini, David Walker, John M. Taylor, and Stanley C. Rall, Jr.: Glycosylation of Human Apolipoprotein E. The Carbohydrate Attachment Site is Threonine 194. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Vol. 264, No. 15, Issue of May 25, pp. 9094-9101, 1989.
13. J.R. Wetterau, L.P. Aggerbeck, S.C. Rall, Jr., and K.H. Weisgraber, (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6240-6248.
14. H. Ito, C. Naito, Y. Suzuki, K. Nakamura & M. Nagase: Post-prandial triglyceride-rich lipoprotein metabolism: possible role of sialylated apolipoprotein E isoproteins. *European Journal of Clinical Investigation* (1994) 24: 468-475.
15. John E. Hokanson and Melissa A. Austin: Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *Journal of Cardiovascular Risk*, 1996, 3:213-219.
16. B.H. Chung, J.P. Segrest, K. Smith, F.M. Griffin, C.G. Brouillette: (1989) Lipolytic surface remnants of triglyceride-rich lipoproteins are cytotoxic to macrophages but not in the presence of high density lipoprotein. *J Clin Invest*, 83:1363-1374.
17. W.A. Bradley, S.H. Gianturco: Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerosis: pathophysiological considerations. *J Intern Med.* 1994; 236 (suppl 736):33-39.
18. S. Tomono, S. Kawazu, N. Kato, T. Ono, C. Ishii, Y. Ito M. Shimizu, M. Shimoyama, T. Nakano, K. Nakajima: (1994) Uptake of remnant like particles (RLP) in diabetic patients from mouse peritoneal macrophages. *J Atheroscler Thromb* 1:98-102.
19. S.H. Gianturco, W.A. Bradley: (1988) Lipoprotein-mediated cellular mechanisms for atherogenesis in hypertriglyceridemia. *Semin Thromb Hemost* 14:165-169.
20. D.B. Zilversmit: A proposal linking atherogenesis to the interaction of endothelial lipoprotein lipase with triglyceride-rich lipoproteins. *Circ Res*, 1973, 33:633-638.
21. B.G. Nordestgaard and A. Tybjaerg-Hansen: IDL, VLDL, Chylomicrons and Atherosclerosis. *Eur. J. Epidemiol.* 0392-2990, Suppl. 1, 1992, p. 92-98. Vol. 8, Suppl. to No. 2.
22. M.A. Austin, J.L. Breslow, C.H. Hennekens, J.E. Buring, K.C. Willett, R.M. Krauss: Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988; 260:1917-1921.
23. E.G. Richards, S.M. Grundy, K. Cooper: Influence of plasma triglycerides on lipoprotein patterns in normal subjects and in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1989; 63:1214-1220.
24. E.J. Schäfer, R.I. Levy, D.W. Anderson, R.N. Dannu, H.B. Brewer: Plasma triglycerides in regulation of HDL-cholesterol. *Lancet* 1978; 2:391-393.
25. J. Johansson, L.A. Carlson, C. Landou, A. Hamsten: High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Atherosclerosis Thromb*, 1991; 11:174-182.

26. Marja-Riitta Taskinen: Triglyceride is the Major Atherogenic Lipid in NIDDM. *Diabetes/Metabolism Reviews*, Vol. 13, No. 2, 93-98 (1997), 1997 by John Wiley & Sons. Ltd.
27. G.J. Miller, N.E. Miller: Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. *Lancet* 1975; i:16-19.
28. T. Gordon, W.P. Castelli, M.C. Hjortland, W.B. Kannel, T.R. Dawber: High density lipoprotein as a protective factor against coronary artery disease: the Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62:707-714.
29. J.L. Breslow: Familial disorders of high density lipoproteins. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill. 1989:2031-2052.
30. A.S. Plump, C.J. Scott, J.L. Breslow: Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9607-9611.
31. B. Blades, G.L. Vega, S.M. Grundy: Activities of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in postheparin plasma of patients with low concentrations of HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb*, 1993; 13:1227-1235.
32. S. Lahdenperä, M. Syväne, J. Kahri, M.-R. Taskinen: Regulation of low-density lipoprotein particle size distribution in NIDDM and coronary disease: importance of serum triglycerides. *Diabetologia* (1996) 39:453-461. Springer-Verlag 1996.
33. M.A. Austin, M.C. King, K.M. Vranizan, R.M. Kraus: (1990) Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 82: 495-506.
34. F. Nigon, P. Lesnik, M. Rouis, M.J. Chapman: (1991) Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J Lipid Res* 32:1741-1753.
35. N.F. Galeano, R. Milne, Y.L. Marcel, M.T. Walsh, E. Levy, Thanh-Dung Ngu'Yen, A. Gleeson, Y. Arad, L. Witte, M. Al-Haider, S.C. Rumsey, R.J. Deckelbaum: Apoprotein B structure and receptor recognition of triglyceride-rich low density lipoprotein (LDL) is modified in small LDL but not in triglyceride-rich LDL of normal size. *J Biol Chem*, 1994; 269 (1):511.
36. V. Anber, B.A. Griffin, M. McConnell, C.J. Packard, J. Shepherd: Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis*, 124 (1996) 261-271.
37. Alan Chait, Ronald L. Brazg, Diane L. Tribble, Ronald M. Krauss: Susceptibility of Small, Dense, Low-Density Lipoproteins to Oxidative Modification in Subjects with the Atherogenic Lipoprotein Phenotype, Pattern B. *The American Journal of Medicine*, April 1993, Volume 94.
38. M.A. Austin, J.L. Breslow, C.H. Hennekens, J.E. Buring, W.C. Willett, and R.M. Kraus: Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*, 260: 1917-1921, 1988.

39. R.M. Krauss: Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and atherosclerotic risk. *Curr Opin Lipidol*, 5: 339-349, 1994.
40. S.M. Grundy: Small LDL, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Circulation* 1997; 95:1-4.
41. N.A. Kaplan: The deadly Quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia and hypertension. *Arch. Intern. Med.* 149 (1989) 1514-1520.
42. S. Asch, D.L. Wingard, E.L. Barrett-Connor: Are insulin and hypertension independently related? *Ann. Epidemiol.* 1 (1991) 231-244.
43. A. Keys: Coronary heart disease - the global picture. *Atherosclerosis* 22 (1975) 149-192.
44. D. Levy, W.B. Kannel: Cardiovascular risks: New insights from Framingham. *Am. Heart J.* 116 (1988) 266-272.
45. G.J. Miller, J.C. Martin, K.A. Mitropoulos, B.E. Reeves, R.L. Thompson, T.W. Meade, et al.: Plasma factor VII is activated by post-prandial triglyceridemia irrespective of dietary fat composition. *Atherosclerosis*, 1991, 86:
46. K.A. Mitropoulos, J.C. Martin, B.E. Reeves, M.P. Estioug: The activation of the contact phase of coagulation by physiologic surfaces in plasma: the effect of large negatively charged liposomal vesicles. *Blood*, 1989, 73:1525-1533.
47. C. De Sousa, C. Soria, M. Ayrault-Jarrier, D. Pastier, E. Bruckert, J. Amiral, et al.: Association between coagulation factors VII and X with triglyceride-rich lipoproteins. *J Clin Pathol*, 1988, 41:940-944.
48. T.W. Meade, M. Brozovic, R. Chakrabarti, A.P. Haines, J.D. Imeson, S. Mellow, et al.: Hemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet*, 1986, ii: 533-537.
49. A. Sitko-Rahm, B. Wiman, A. Hamsten, J. Nilsson: Secretion of plasminogen activator inhibitor-1 from cultured human umbilical vein endothelial cells is induced by very low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*, 1990, 10:1067-1073.
50. A. Hamsten, W. Bjorn, U. De Faire, M. Blomback: Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1985, 313:1557-1563.
51. W.A. Bradley, J.-N. Song, S.H. Gianturco: Thrombin/prothrombin interactions with very low density lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci*, 1986, 485:159-169.
52. S.P. Bajaj, J.A. Harmony, M. Martinez-Carrion, F.J. Castellino: Human plasma lipoproteins as accelerators of prothrombin activation. *J Biol Chem*, 1976, 251:5233-5236.
53. R. Knöfler, T. Nakano, K. Nakajima, Y. Takada, A. Takada: (1995) Remnant-like lipoproteins stimulate whole blood platelet aggregation in vitro. *Thromb Res*, 74:161-171.
54. F. Karpe, A. Hamsten: Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 6:123-129, 1995.

55. C.F. Ebenbichler, R. Kirchmair, C. Egger, and J.R. Patsch: Postprandial state and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 6:286-290, 1995.
56. J.R. Patsch, G. Meisenböck, T. Hopferwieser, V. Mühlberger, E. Knapp, J.K. Dunn, A.M. Gotto, Jr., and W. Patsch: Relation of triglyceride metabolism and coronary heart diseases, studies in the postprandial state. *Arterioscler Thromb*, 12:1336-1345, 1992.
57. H.S. Simpson, C.M. Williamson, T. Olivecrona, J. Pringle, J. Maclean, A.R. Lorimar, F. Bonnefous, Y. Bogaievsky, C.J. Packard, and J. Shepherd: Postprandial lipaemia, fenofibrate and coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 85:193-202, 1990.
58. J.S. Cohn: Postprandial lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 5:185-190, 1994.
59. N. Yamada, T. Murase, Y. Akanuma, H. Itakura and K. Kosaka: Plasma Apolipoprotein E Levels in Hypertriglyceridemia. *Horm. metabol. Res.*, 14 (1982) 303-306.
60. J.S. Cohn, M. Tremblay, M. Amiot, D. Bouthillier, M. Roy, J. Genest, Jr., J. Davignon: Plasma Concentration of Apolipoprotein E in Intermediate-Sized Remnant-Like Lipoproteins in Normolipidemic and Hyperlipidemic Subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Vol. 16, No. 1, Jan. 1996.
61. Emi, M., Wu, L.L., Robertson, Ma., et. al.: Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics* 1998; 3:373-379.
62. Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J., and Stanley, K.K.; The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein; *Nature (London)*, 341, 162, 1989.
63. Weisgraber, K., Structure and Function of Apolipoprotein E. (<http://Gladstone.ucsf.edu/gicd/weisgraberc.html>)
64. Weisgraber, K. et al.: Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia; (<http://www.ccp14.ac.uk/ccp/web-mirrors/llnlrupp/apoe/apoe.html>)
65. Marmillot, P. et al.: Desialylation of human apolipoprotein E decreases its binding to human high-density lipoprotein and its ability to deliver esterified cholesterol to the liver; *Metabolism*, 1999 Sep; 48(9): 1184-93 (ISSN: 0026-0495)
66. Pickup, J.C. et al.: Plasma sialic acid in animal models of diabetes mellitus: evidence for modulation of sialic acid concentrations; *Life Sci* 1995; 57(14):1383-91 (ISSN: 0024-3205)
67. Crook, M. et al.: Serum sialic acid in young type-1 diabetic patients; *Diabetes Res Clin Pract* 2000 Feb.; 47(2): 119-22 (ISSN: 0168-8227)
68. Wakabayashi, I. et al.; Serum sialic acid concentration and atherosclerotic risk factors; *J Atheroscler Thromb* 1994; 1(2): 113-7 (ISSN: 1340-3478)

- 69.- Crook, M. et al.: Serum total sialic acid, a reputed cardiovascular risk factor, and its relationship to lipids, plasma fasting insulin, blood pressure and body mass index in normal individuals; *Clin Sci (Colch)* 1998 Jul; 95(1):53-7 (ISSN: 0143-5221)
70. Ponnio, M. et al.: Serum sialic acid in random sample of the general population; *Clin Chem* 1999 Oct; 45(10): 1842-9 (ISSN: 0009-9147)
71. Lindbohm, N. et al.: Sialic acid content of LDL and lipoprotein metabolism in combined hyperlipidemia and primary moderate hypercholesterolemia; *Clin Chim Acta* 1999 Jul; 285(1-2): 69-84 (ISSN: 0009-8981)
72. Millar, J.S. et al.: Sialic acid-containing components of lipoproteins influence lipoprotein-proteoglycan interactions; *Atherosclerosis* 1999 Aug; 145(2): 253-60 (ISSN: 0021-9150)
73. Melajarvi, N. et al.: Sialic acids and the metabolism of low density lipoprotein; *J Lipid Res* 1996 Aug; 37(8): 1625-31 (ISSN: 0022-2275)
74. Tertov, V.V. et al.: Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma possible mechanism of in vivo lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification; *Atherosclerosis* 1998 May; 138(1): 183-95 (ISSN: 0021-9150)
75. Lindbohm, N. et al.: Sialic acid content of low density lipoprotein and its relation to lipid concentrations and metabolism of low density lipoprotein and cholesterol; *J Lipid Res* 2000 Jul; 41(7): 1110-7 (ISSN: 0022-2275)
76. Mahley, R.W. et al.: Low levels of high density lipoproteins in Turks, a population with elevated hepatic lipase. High density lipoprotein characterization and gender-specific effects of apolipoprotein e genotype; *J Lipid Res* 2000 Aug; 41(8): 1290-301 (ISSN: 0022-2275)
77. Srinivasan, S.R. et al.: The relation of apolipoprotein E polymorphism to multiple cardiovascular risk in children: the Bogalusa Heart Study; *Atherosclerosis* 1996 Jun; 123(1-2): 33-42 (ISSN: 0021-9150)
78. Hu, D. et al.: Effects of obesity and body fat distribution on lipids and lipoproteins in nondiabetic American Indians: the Strong Heart Study. [In Process Citation]; *Obes Res* 2000 Sep; 8(6): 411-421 (ISSN: 1071-7323)
79. Shuvaev, V.V. et al.: Glycation of apolipoprotein E impairs its binding to heparin: identification of the major glycation site; *Biochem Biophys Acta* 1999 Aug 30; 1454(3): 296-308 (ISSN: 0006-3002)
80. Chappey, B. et al.: Evaluation of the sialic acid content of LDL as a marker of coronary calcification and extracoronary atherosclerosis in asymptomatic hypercholesterolemic subjects. PCVMETRA Group; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 Mar; 15(3): 334-9 (ISSN: 1079-5642)
81. Lakshman, M.R. et al.: Alcohol and molecular regulation of protein glycosylation and function; *Alcohol* 1999 Nov; 19(3): 239-47 (ISSN: 0741-8329)

82. Brinton, E.A. et al.: Human HDL cholesterol levels are determined by apoA-I fractional catabolic rate, which correlates inversely with estimates of HDL particle size. Effects of gender, hepatic and lipoprotein lipases, triglyceride and insulin levels, and body fat distribution; *Arterioscler Thromb* 1994 May; 14(5): 707-20 (ISSN: 1049-8834)
83. Rao, M.N. et al.: High-density lipoproteins from human alcoholics exhibit impaired reverse cholesterol transport function [In Process Citation] ; *Metabolism* 2000 Nov; 49(11): 1406-10 (ISSN: 0026-0495)
84. Sillanaukee, P. et al.: Alcohol consumption and its relation to lipid-based cardiovascular risk factors among middle-aged women: the role of HDL(3) cholesterol [In Process Citation] *Atherosclerosis* 2000 Oct.;152(2):503-10 (ISSN: 0021-9150)
85. Lucas, M. et al.: Lipoprotein lipase reduces secretion of apolipoprotein E from macrophages; *J Biol Chem* 1997 May 16; 272(20): 13000-5 (ISSN: 0021-9258)
86. St-Amand, J. et al.: The relation of plasma triglyceride, apolipoprotein B, and high-density lipoprotein cholesterol to postheparin lipoprotein lipase activity is dependent on apolipoprotein E polymorphism; *Metabolism* 1996 Feb; 45(2):261-7 (ISSN: 0026-0495)
87. Tashiro, J. et al.: Modification of lipoprotein lipase catalytic activity by sialic acids; *Scand J Clin Lab Invest* 1999 Apr; 59(2): 71-6 (ISSN: 0036-5513)
88. Mahley, R. Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with expanding Role in Cell Biology; *Science*, 1988; Vol. 240; 622-40
89. Linton, M.; Atkinson, J.; Fazio, S. Prevention of Artherosklerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice by Bone Marrow Transplantation *Science* ,1995; Vol. 267; 1034-37
90. Schwandt P., Richter W., Parhofer K. (2001) Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, 2. Auflage Schattauer, Stuttgart New York: 4
91. Stryer, L.: Biochemistry; Oxford: Spektrum Akad. Verlag, 1994
92. Schwandt P., Richter W., Parhofer K. (2001) Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, 2. Auflage Schattauer, Stuttgart New York: 47
93. Schwandt P., Richter W., Parhofer K. (2001) Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, 2. Auflage Schattauer, Stuttgart New York: 10
94. Schwandt P., Richter W., Parhofer K. (2001) Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, 2. Auflage Schattauer, Stuttgart New York: 75
95. Schwandt P., Richter W., Parhofer K. (2001) Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, 2. Auflage Schattauer, Stuttgart New York: 13
96. Schwandt P., Richter W., Parhofer K. (2001) Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, 2. Auflage Schattauer, Stuttgart New York: 12

97. Schwandt P., Richter W., Parhofer K. (2001) Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, 2. Auflage Schattauer, Stuttgart New York: 13
98. Schwandt P., Richter W., Parhofer K. (2001) Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, 2. Auflage Schattauer, Stuttgart New York: 17

~~~~~

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Lipoproteins geringer Dichte (aus: Biochemistry/Lubert Stryer, Spektrum Chemie, 1994)
- Abbildung 2: Apolipoprotein E Sekundärstruktur aus: Glycosylation of Human Apolipoprotein E; Mary Ellen Wernette-Hammond et al.; The Journal of Biological Chemistry, 1989, Vol. 264, No. 15, 9094-9101.
- Abbildung 3: Dreidimensionale Darstellung der Apolipoprotein E Sekundärstruktur, aus: Form and Function in Apolipoprotein E; Weisgraber et al. (<http://gladstone.ucsf.edu/pubs/Focus/FocusS97/weisgraber.html>)
- Abbildung 4: Apolipoprotein E Phänotypisierung in der Isoelektrischen Fokussierung.
- Abbildung 5: Darstellung von N-Acetylneuraminsäuren (offene und Pyranoseform)
- Abbildung 6: Vorgeschlagene Nomenklatur von Apo E Phänotypen, aus: Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes; *Journal of Lipid Research*, Vol. 23, 1982.
- Abbildung 7: Apolipoprotein E Phänotypisierung in der IEF nach Schwandt/ Richter/ Parhofer [97]
- Abbildung 8: Darstellung der Bildung von kleinen dichten LDL- und HDL-Partikeln
- Abbildung 9: Schematische Darstellung von Lipoproteininteraktion bei Hypertriglyceridämie
- Abbildung 10: Darstellung der densitometrischen Auswertung einer Apo E Phänotypisierung (hier Apo E2/3-Genotyp, s bzw. ss = Extrabanden durch ein- oder zweifach sialisiertes Apo E)
- Abbildung 11: Beispiel einer graphischen Darstellung eines Dichtegradienten bei Apo E Typ 3/3
- Abbildung 12: Beispiel einer graphischen Darstellung eines Dichtegradienten bei Dysbetalipoproteinämie
- Abbildung 13 bis 42: Blot der isoelektrischen Fokussierung der Patienten 1-15 sowie Darstellung der densitometrischen Auswertung der Patienten 1-15
- Abbildung 43: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und BMI
- Abbildung 44: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und Cholesterinspiegel
- Abbildung 45: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und HDL-Cholesterin
- Abbildung 46: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und LDL-Cholesterin
- Abbildung 47: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und VLDL-Cholesterin
- Abbildung 48: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und Triglyzeridspiegel

Abbildung 49: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und dem Plasmaglukosespiegel

Abbildung 50: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und Apolipoprotein E Gesamtmasse

Abbildung 51: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und Apo E-Masse in der HDL3-Fraktion

Abbildung 52: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und Apo E-Masse in der HDL 2-Fraktion

Abbildung 53: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und Apo E-Masse in der VLDL-Fraktion

Abbildung 54: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und der Lipoproteinlipaseaktivität

Abbildung 55: Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und der Aktivität der Hepatischen Lipase

~~~~~

### 8.3 Tabellenverzeichnis und Datentabellen

Tabelle 1: Physikalische Lipoproteinparameter

Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung der Plasmalipoproteine

Tabelle 3: Apolipoproteine aus: Schwandt/Richter: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, Schattauer 1996

Tabelle 4: Ladungsdifferenzen der unterschiedlichen Apolipoprotein E Isoformen

Tabelle 5 bis 19 Densitometrische Quantifizierung der Sialo-Apo E-Masse vor/nach Neuraminidasebehandlung

Tabelle 20: Daten zur Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und BMI

Prozentuale Veränderung der Sialo-Apo E-Masse nach Neuraminidasebehandlung (%)	BMI kg/m <sup>2</sup>
5,42	25
16,66	28
26,98	26
29,03	25
38,89	33
47,06	28
47,82	27
57,13	30
57,68	26
64,10	31
68,75	31
69,57	23
90,91	31
100	24
100	24

Tabelle 21: Genotypen nach Sialisierungsgrad sortiert

$\Delta$ vor/nach Neuraminidase	Genotyp	Phänotyp/ Gradient
5,42%	<b>2/2</b>	2/2s2 G: Typ III
16,66%	<b>2/2</b>	2/2s2 G: Typ III
26,98%	<b>2/2</b>	2/2s2 G: Typ III
29,03%	<b>2/2</b>	2/2s2 G: Typ III
38,89%	<b>2/2</b>	2/2s2 G: Typ III
47,06%	1/2	1/2s1 G: Typ III
47,82%	2/3	2/3s2 G: norm.
57,13%	3/4	3/4s1 G: norm.
57,68%	2/3	2/3s2 G: norm.
64,10%	3/3	3/3s2 G: norm.
68,75%	2/3	2/3s2 G: norm.
69,57%	3/4	3/4s1 G: norm.
90,91%	3/4	3/4s1 G: norm
100,00%	2/3	2/3s2 G: norm
100,00%	3/3	3/3s2 G: norm

Typ III: Dichtegradient wie bei Dysbetalipoproteinämie  
norm.: Dichtegradient wie bei gesundem Proband

Tabelle 22: Darstellung der Sialisierungszahl (einfach oder doppelt)

<b>Apo E-Genotyp</b>	<b>einfach/doppelt sialisiert</b>
1/2 (n=1)	d
2/2 (n=5)	5*e
2/3 (n=4)	4*d
3/3 (n=2)	1*e, 1*d
3/4 /n=3)	3*e

Tabelle 23: Daten zur Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und den Cholesterinfraktionen

Prozentuale Veränderung der Sialo-Apo E-Masse nach Neuraminidasebehandlung (%)	Chol. (mg/dl)	HDL-Chol. (mg/dl)	LDL-Chol. (mg/dl)	VLDL-Chol. (mg/dl)
5,42	467	45	46	213
16,66	444	26	88	137
26,98	350	58	53	138
29,03	315	36	71	46
38,89	312	37	67	28
47,06	409	54	56	155
47,82	322	65	113	68
57,13	275	43	119	33
57,68	283	40	119	38
64,10	215	29	76	40
68,75	252	39	105	49
69,57	217	57	115	9
90,91	222	34	145	9
100	145	36	80	4
100	221	84	111	3

Tabelle 24: Daten zur Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und TG

Prozentuale Veränderung der Sialo-Apo E-Masse nach Neuraminidasebehandlung (%)	TG (mg/dl)
5,42	706
16,66	889
26,98	280
29,03	427
38,89	382
47,06	657
47,82	595
57,13	476
57,68	619
64,10	378
68,75	404
69,57	103
90,91	178
100	65
100	73

Tabelle 25: Daten zur Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und Plasmaglucoese

Prozentuale Veränderung der Sialo-Apo E-Masse nach Neuraminidasebehandlung (%)	Plasmaglucoese nüchtern (mg/dl)
5,42	88
16,66	79
26,98	116
29,03	83
38,89	100
47,06	80
47,82	95
57,13	87
57,68	80
64,10	84
68,75	150
69,57	80
90,91	78
100	92
100	79

Tabelle 26: Daten zur Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und der Apolipoprotein E-Gesamtmasse sowie der HDL2- und HDL3-Subfraktion

Prozentuale Veränderung der Sialo-Apo E-Masse nach Neuraminidasebehandlung (%)	Apolipoprotein E-Gesamtmasse (µg/ml)	Apo E-Masse HDL3- (µg/ml)	Apo E-Masse HDL2- (µg/ml)
5,42	222	51,92	39,99
16,66	229	34,85	16,73
26,98	182	37,56	25,45
29,03	236	31,76	30,91
38,89	141	33,08	18,72
47,06	173	30,67	11,21
47,82	130	33,99	20,32
57,13	56	32,24	21,93
57,68	129	32,59	21,94
64,10	160	23,59	10,09
68,75	88	40,34	21,22
69,57	105	11,72	11,23
90,91	141	13,99	4,43
100	20	7,47	12,07
100	65	10,10	57,89

Tabelle 27: Daten zur Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und der Apolipoprotein E-Masse in VLDL

Prozentuale Veränderung der Sialo-Apo E-Masse nach Neuraminidasebehandlung (%)	Apo E-Masse VLDL (µg/ml)
5,42	22,05
16,66	17,15
26,98	16,57
29,03	47,61
38,89	16,81
47,06	13,86
47,82	16,18
57,13	69,93
57,68	30,39
64,10	29,91
68,75	29,02
69,57	10,37
90,91	24,84
100	7,41
100	6,65

Tabelle 28: Daten zur Korrelation von Sialo-Apo E-Masse und LpL-/HL-Aktivität

Prozentuale Veränderung der Sialo-Apo E-Masse nach Neuraminidasebehandlung (%)	LpL-Aktivität (% vom Rferenzwert)	HL-Aktivität (% vom Rferenzwert)
5,42	51	78
16,66	76	89
26,98	82	91
29,03	57	58
38,89	170	275
47,06	105	90
47,82	116	82
57,13	121	103

~~~~~

## 8.4 Abkürzungsverzeichnis

|        |                                                  |
|--------|--------------------------------------------------|
| Apo:   | Apolipoprotein                                   |
| Arg:   | Arginin                                          |
| Asp:   | Asparagin                                        |
| BMI:   | Body-mass-index                                  |
| CETP:  | Cholesterinester-Transfer-Protein                |
| CM:    | Chylomikronen                                    |
| DNS:   | Desoxyribonukleinsäure                           |
| GT:    | Genotyp                                          |
| HDL:   | High-density-lipoprotein                         |
| HL:    | Hepatische Lipase                                |
| HLP:   | Hyperlipoproteinämie                             |
| HTG:   | Hypertriglyceridämie                             |
| IDDM:  | Insulin-dependant-diabetes mellitus              |
| IDL:   | Intermediate-density-lipoprotein                 |
| IEF:   | Isoelektrische Fokussierung                      |
| KHK:   | Koronare Herzerkrankung                          |
| LCAT:  | Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase            |
| LDL:   | Low-density-lipoprotein                          |
| LDL-R: | Low-density-lipoprotein-Rezeptor                 |
| LPL:   | Lipoproteinlipase                                |
| LRP:   | Low-density-lipoprotein-Rezeptor-related-Peptide |
| NIDDM: | Non-insulin-dependant-diabetes mellitus          |
| OD :   | Optische Dichte                                  |
| PAI :  | Plasminogen-Aktivator-Inhibitor                  |
| RNS:   | Ribonukleinsäure                                 |
| TG:    | Triglycerid/e                                    |
| Thr:   | Threonin                                         |
| VLDL:  | Very-low-density-lipoprotein                     |

## 9. Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel für die interessante Aufgabenstellung, die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft, selbst an Wochenenden, für Anregungen und die Bereitstellung aller labortechnischer Einrichtungen und Materialien.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biochemie, insbesondere Christine Runge, Daniela Berg, Helga Reschke und Nicolette Donarsky danke ich sehr für die vielfältige fachliche Unterstützung bei der Anwendung verschiedener biochemischer Verfahrenstechniken; vor allem steuerten sie genau im richtigen Verhältnis Kritik, Rat und Ermunterung bei. Ihre Einfühlsamkeit, Intelligenz und gute Laune erleichterten mir meine Aufgabe.

Meinem Bruder Nicholas Orth danke ich für seine Hilfe bei der graphischen Ausgestaltung und der Lösung programmtechnischer Computerprobleme. Nicht versäumen will ich, mich bei Frau Charlotte Orth für ihre Unterstützung beim Layout, der Fehlerkorrektur und von Detailverbesserungen zu bedanken.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Eltern und meiner Freundin, die jeweils auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Tim André Orth

März 2003

## 10. Lebenslauf

Vornamen, Name: Tim André Orth  
Geburtsort: Frankfurt am Main  
Geburtsdatum: 13.04.1973

Vater: Dr. med. Helmut Orth, Internist – Nephrologe – Psychotherapeut  
Mutter: Dorothea Orth-Tannenberg, Cutterin

Schule: Altkönigsgymnasium Kronberg,  
währenddessen ein Jahr Schulbesuch in den U.S.A.  
Abitur 1993

Zivildienst: 15 Monate in der Endoskopischen Abteilung der Städtischen  
Kliniken Frankfurt am Main-Hoechst

Studium: Beginn 1995 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
(UKE),  
Physikum: 1997, Note „gut“ (2,0)  
1. Staatsexamen: 1998, Note „gut“ (2,0)  
2. Staatsexamen: 2000, Note „sehr gut“ (1,0)  
3. Staatsexamen: 2001, Note „sehr gut“ (1,0)  
Abschluß des Studiums der Humanmedizin 2001 mit der Gesamt-  
note „sehr gut“ (1,16)

Doktorarbeit: bei Frau Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel,  
Abteilung für Molekulare Zellbiologie, Institut für Medizinische  
Biochemie und Molekularbiologie, Universitätsklinikum  
Hamburg- Eppendorf  
„Steht die Sialisierung von Apolipoprotein E im Plasma im  
Zusammenhang mit Hyperlipoproteinämien?“

Praktisches Jahr: UKE Hamburg

1. Tertial  
(Innere Medizin) 1. Hälfte: Gastroenterologische Abteilung (Prof. Dr. Greten)  
2. Hälfte: Endokrinologische Abteilung (Prof. Dr. Greten)

2. Tertial  
(Chirurgie) 1. Hälfte: Herz- und Gefäßchirurgische Abteilung (Dr.  
Tsilimingas)  
2. Hälfte: Hepatobiliäre Chirurgie (Prof. Dr. Izbicki)

3. Tertial  
(HNO, Wahlfach) Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (Prof. Dr. Koch)

AIP : Klinik für Innere Medizin, Abteilung Nephrologie, St. Markus  
Krankenhaus in Frankfurt/Main (Prof. Dr. P. Grützmacher)  
01.06.2001.- 01.12.2002

Seit 01.12.2002 Assistenzarzt in o.g. Abteilung; aktuell Betreuung von Intensivstation  
und Akutdialyse.

## **11. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Tim André Orth

Frankfurt am Main, den 17.03.2003